

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE MEDICINA
Departamento de Microbiología I



TESIS DOCTORAL

**Origen y caracterización de los linfocitos TCR- $\alpha\beta$ +CD4-CD8-doble
negativos en relación a su posible naturaleza autorreactiva**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Noé Rodríguez Rodríguez

Directores

José Carlos Crispín
José Manuel Martín Villa
George C. Tsokos

Madrid, 2018

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

Facultad de Medicina

Departamento de Microbiología I

Doctorado en Ciencias Biomédicas



TESIS DOCTORAL

Origen y Caracterización de los Linfocitos TCR- $\alpha\beta$ ⁺CD4⁻CD8⁻

Doble Negativos

en relación a su posible naturaleza autorreactiva

Memoria para optar al grado de doctor presentada por:

NOÉ RODRÍGUEZ RODRÍGUEZ

Directores:

JOSÉ CARLOS CRISPÍN

JOSÉ MANUEL MARTÍN VILLA

GEORGE C. TSOKOS

Madrid, 2017



UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

Facultad de Medicina

Departamento de Microbiología I, Área de Inmunología

Doctorado en Ciencias Biomédicas (R.D. 1393/2007)

Título de la Tesis

Origen y Caracterización de los Linfocitos TCR- $\alpha\beta^+$ CD4 $^-$ CD8 $^-$ Doble Negativos en relación a su posible naturaleza autorreactiva

Tesis Doctoral presentada por

Noé Rodríguez Rodríguez para optar al grado de doctor

Tesis doctoral dirigida por los Doctores

José Carlos Crispín, José Manuel Martín Villa y George C. Tsokos

Madrid 2017



Informe del Director de la Tesis Doctoral

DATOS DE LA TESIS DOCTORAL	
Nombre del Doctorando	<i>Noé Rodríguez Rodríguez</i>
Título de la Tesis	<i>Origen y Caracterización de los Linfocitos TCR-$\alpha\beta$+CD4-CD8- Doble Negativos en Relación a su Posible Naturaleza Autorreactiva</i>
Facultad o Centro	<i>Facultad de Medicina</i>

DATOS DEL DIRECTOR DE LA TESIS DOCTORAL	
Nombre Completo	<i>José Carlos Crispín Acuña</i>
Centro al que pertenece y dirección	<i>Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán Vasco de Quiroga #15, Ciudad de México, C.P. 14080, México</i>
D.N.I/Pasaporte	<i>12816444732</i>
e-mail	<i>carlos.crispina@incmnsz.mx</i>

	VALORACIÓN DE LA TESIS			
	<i>Muy Buena</i>	<i>Buena</i>	<i>Suficiente</i>	<i>Deficiente</i>
Originalidad	<i>X</i>			
Definición Objetivos	<i>X</i>			
Metodología	<i>X</i>			
Relevancia Resultados	<i>X</i>			
Discusión / Conclusiones	<i>X</i>			

INFORME (en caso necesario se podrán añadir más hojas):

El trabajo que se somete a la consideración de la Comisión de doctorado para su posible defensa como tesis doctoral tiene como objetivo central determinar en qué situaciones las células T CD8⁺ pierden la expresión del co-receptor CD8 y se vuelven dobles negativas (DN; CD4⁻CD8⁻). Para evaluar ese fenómeno, se usaron dos cepas de ratones que expresan un receptor de células T transgénico (OT-I y H-Y) con el fin de evaluar, en diferentes situaciones, a las mismas células T CD8⁺ reconociendo a los mismos antígenos. Los resultados muestran que durante respuestas inmunes productivas (p. ej. durante una infección aguda por *Listeria monocytogenes*), las células mantienen la expresión de CD8. Sin embargo, cuando el antígeno es reconocido como propio, las células CD8 sufren un proceso de “tolerización” que involucra la pérdida del co-receptor y la expresión de moléculas inhibitorias, en particular PD-1. El trabajo incluye la caracterización fenotípica de las células DN derivadas de células CD8⁺ autoreactivas lo que permitió al doctorando detectar una población análoga en ratones silvestres, no manipulados. En conjunto, los resultados que conforman este trabajo, apoyan la existencia de un mecanismo de tolerancia periférica que limita la activación de células T CD8⁺ a través de la modulación a la baja de CD8 y de la expresión de PD-1. El trabajo se desarrolló en Estados Unidos y en México con el uso de

citometría de flujo y biología celular y molecular. De él se derivaron directamente dos artículos donde el doctorando es el primer autor (*J Immunol*, 2015; *Eur J Immunol*, 2016). En base a lo anterior, considero que reúne el mérito para su defensa ante la Comisión de doctorado.

Noé es el mejor alumno de doctorado que ha tenido mi laboratorio y, a mi juicio, es el mejor alumno que hubo en la División de Reumatología del Beth Israel Deaconess Medical Center (Boston, EUA) y en el Departamento de Inmunología y Reumatología del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán (Ciudad de México) durante los años en los que trabajó ahí. Desde su llegada al laboratorio asumió el proyecto como suyo y no sólo realizó todos los experimentos del proyecto, sino que participó de manera activa y muy valiosa en la conducción del proyecto, el análisis de los resultados y la escritura de los manuscritos. En Boston y en México, Noé se ganó la amistad, el respeto y la admiración de todos los miembros del grupo y de los grupos vecinos, por lo que además del trabajo que aquí se presenta, participó en otros proyectos donde aparece como coautor en artículos publicados en *PNAS* (2014), *J Biol Chem* (2014) y *Nature Immunology* (2016). Noé termina este periodo de su vida con mucho éxito, preparado para realizar una estancia posdoctoral de excelencia que le facilitará establecerse como un investigador independiente.

Ciudad de México, a 15 de febrero de 2017

Fdo.:



Este impreso deberá entregarse al Departamento/Órgano responsable del Posgrado/ Comisión responsable del Programa de Doctorado, para su estudio y aprobación en la admisión a trámite de la tesis doctoral. Asimismo, deberá incluirse entre la documentación enviada a la Comisión de Doctorado para la designación del Tribunal y aprobación de la defensa de la Tesis Doctoral.



Informe del Director de la Tesis Doctoral

DATOS DE LA TESIS DOCTORAL	
Nombre del Doctorando	Noé Rodríguez Rodríguez
Título de la Tesis	Origen y Caracterización de los Linfocitos TCR- $\alpha\beta$ +CD4-CD8- Doble Negativos en relación a su posible naturaleza autorreactiva
Facultad o Centro	Facultad de Medicina

DATOS DEL DIRECTOR DE LA TESIS DOCTORAL	
Nombre Completo	JOSÉ MANUEL MARTÍN VILLA
Centro al que pertenece y dirección	INMUNOLOGÍA. FACULTAD DE MEDICINA. UCM
D.N.I./Pasaporte	05377375K
e-mail	jmmvilla@ucm.es

	VALORACIÓN DE LA TESIS			
	Muy Buena	Buena	Suficiente	Deficiente
Originalidad	X			
Definición Objetivos	X			
Metodología	X			
Relevancia Resultados	X			
Discusión / Conclusiones	X			

INFORME (en caso necesario se podrán añadir más hojas):

Madrid, a 20 FEBRERO 2017

MARTIN VILLA
JOSE MANUEL
- 05377375K

Firmado digitalmente por MARTIN VILLA JOSE MANUEL - 05377375K
Nombre de reconocimiento (DN): c=ES, serialNumber=05377375K, sn=MARTIN VILLA, givenName=JOSE MANUEL, cn=MARTIN VILLA JOSE MANUEL - 05377375K
Fecha: 2017.02.20 12:31:24 +01'00'

Fdo.:

Este impreso deberá entregarse al Departamento/Órgano responsable del Posgrado/ Comisión responsable del Programa de Doctorado, para su estudio y aprobación en la admisión a trámite de la tesis doctoral. Asimismo, deberá incluirse entre la documentación enviada a la Comisión de Doctorado para la designación del Tribunal y aprobación de la defensa de la Tesis Doctoral.



Report from the Director of the PhD Dissertation

DATOS DE LA TESIS DOCTORAL	
Nombre del Doctorando	Noé Rodríguez Rodríguez
Título de la Tesis	<i>Ontogeny and Phenotype of TCR-$\alpha\beta$+CD4-CD8- Double Negative T lymphocytes with regards to their self-reactive nature</i> (Origen y Caracterización de los Linfocitos TCR- $\alpha\beta$ +CD4-CD8- Doble Negativos en relación a su posible naturaleza autorreactiva)
Facultad o Centro	Facultad de Medicina

DATOS DEL DIRECTOR DE LA TESIS DOCTORAL	
Nombre Completo	George C. Tsokos
Centro al que pertenece y dirección	Division of Rheumatology, Department of Medicine. (División de Reumatología, Departamento de Medicina) Beth Israel Deaconess Medical Center, Harvard Medical School
Passport	490899510
e-mail	gtsokos@bidmc.harvard.edu

	VALORACIÓN DE LA TESIS			
	Very Good	Good	Sufficient	Deficient
Originality	X			
Aims definition	X			
Methods	X			
Relevance of results	X			
Discussion/Conclusions	X			

Report (continue on the back or attach as many pages as deemed necessary):

Noé Rodríguez have been working in my research laboratory for 4 years after he started his PhD program. During this time I co-supervised Noe's research and learning together with D. Crispín, a former member of my group. Noé quickly became an active member of my lab, participating in all the seminars and journal sessions we hold in the department, collaborating with the rest of my postdocs and lab members, helping them scientifically and technically with their projects. In addition he took advantage of our working environment engaging in the seminars and workshops that were being presented in the Harvard community.

His dissertation work puts in perspective a long time non-resolved question regarding the nature of DN T cells in the context of autoimmunity. These lymphocytes has been study for during the past three decades in the lupus MRL/lpr mouse model but there were no clear evidence suggesting the DN T lymphocyte population represents a self-reactive T cell. We have extensive experience working with this mouse model and these cells, identifying key alterations that they share with T cells from lupus patients. Noe decided to address this risky project during his PhD work and make it his own. His ingenuity and creativity, always seeking new methods and research tools achieve the important work he is presenting now in his dissertation. He always used logic when facing new challenges and put in hard work during all these years

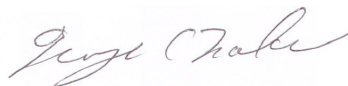
The text he presents here clear and important defined aims and a sensible hypothesis based on all the previous literature in the field. His methodology is impeccable and he did not skimp in the necessary reagents or finding mouse strains nor learning new methods that we did not used previously in my lab.

The results he presents, though needed of further work and confirmation in human samples, stand very critical to understand the importance of DN T cells in the context of autoimmunity. The discovery that in mice self-reactive CD8 T cells become DN T cell and produce important amount of Il-17 and the definition of this lymphocyte population in peripheral tissues represent novel and significant results in the field of Immunology. In addition he puts his finding in context in a comprehensive discussion, where he clearly identifies the missing gaps that require further research and the pivotal points that his work provides.

Therefore I would like to recommend Noé's dissertation for the highest grade that University Complutense of Madrid assigns.

Boston, February 20th, 2016

Signature:



Este impreso deberá entregarse al Departamento/Órgano responsable del Posgrado/ Comisión responsable del Programa de Doctorado, para su estudio y aprobación en la admisión a trámite de la tesis doctoral. Asimismo, deberá incluirse entre la documentación enviada a la Comisión de Doctorado para la designación del Tribunal y aprobación de la defensa de la Tesis Doctoral.

Tesis Doctoral

Origen y Caracterización de los Linfocitos TCR- $\alpha\beta^+$ CD4 $^-$ CD8 $^-$ Dobles Negativos en relación a su posible naturaleza autorreactiva

Esta memoria ha sido presentada por el maestro Noé Rodríguez Rodríguez para optar al grado de Doctor por el programa de doctorado en Ciencias Biomédicas (RD1393/2007).

Directores de la Tesis:

Dr. José Carlos Crispín Acuña

Dr. José Manuel Martín Villa

Dr. George C. Tsokos

Departamento de Microbiología I (área de Inmunología)

Facultad de Medicina

Universidad Complutense de Madrid

Este trabajo ha sido realizado en el laboratorio del Dr. George C. Tsokos en el Departamento de Medicina (División de Reumatología) del Beth Israel and Deaconess Medical Center (Boston, EEUU) y en el Departamento de Inmunología y Reumatología del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán (Ciudad de México, México). Este trabajo ha sido financiado por los proyectos de R21 AR063262 del Instituto Nacional para artritis y enfermedades musculoesqueléticas y dermatológicas (NIAMS) y R01 AI085567 del Instituto Nacional de Alergia y Enfermedades Infecciosas (NIAID) del Instituto Nacional de Salud de Estados Unidos y por la beca "Careers in Immunology Fellowship" de la Sociedad Americana de Inmunólogos (AAI).

*A mi familia: mi hermana Aura, mi padre Aníbal y mi madre Montse
Por ser las luces que siempre me han mostrado que hay un camino en la oscuridad
Y a Dann*

*"I wish it need not have happened in my time," said Frodo.
"So do I," said Gandalf, "and so do all who live to see such times. But that is not for them to decide. All we have
to decide is what to do with the time that is given us."
El señor de los anillos – J.R.R. Tolkien*

*"Si los hombres supiesen lo que es la muerte ya no le tendrían miedo. Y si ya no le tuvieran miedo, nadie podría
robarles, nunca más, su tiempo de vida."
Momo – Michael Ende*

Agradecimientos

Aunque ésta debería ser la sección de la presente tesis más sencilla de escribir, sé que va a ser difícil ser sucinto y a la par poder expresar mi agradecimiento a todas esas personas, maestros, amigos y familia que han estado a mi lado a lo largo de estos 30 años. Y sí, no he perdido la razón -al menos no mucho más que muchos- y es mi intención referirme a estos 30 años porque, si bien no resto mérito a lo que he logrado por mí mismo, soy consciente de que no lo hubiese conseguido sin el incondicional y desinteresado apoyo y ayuda de muchos. Asimismo sé que no soy el único que está agradecido y que en particular todos los que perseguimos esta nuestra carrera de investigador así nos sentimos. Pero quizá, y solo quizá, en mi caso es especialmente una realidad el hecho de que no hubiese superado cada una de las etapas de mi vida que me han conducido aquí, o no me hubiese atrevido a viajar a la siguiente, sin esas personas tan especiales, cada uno a su manera. Así pues, si eres una de ellas, y de ser así, lo sabes...

Gracias.

En primer lugar me gustaría empezar agradeciendo su ayuda y paciencia a todos aquellos colaboradores que nos proporcionaron sus reactivos, su material y su experiencia para poder llevar nuestros proyectos a buen término: Arlene Sharpe y Peter T. Sage por habernos regalado los ratones deficientes de PD-1 y PD-L1; Dennis Kasper, Isaac Kasper y Francesca S. Gazzaniga, que generosamente nos cedieron los ratones “germ-free”; Lydia Lynch y sus estudiantes por los ratones deficientes de CD1. Agradecer a Christophe Benoist, Noriyuku Fujikado, Matthew Meredith y Angela Magnuson sus consejos y donarnos los ratones AireKO que nos fueron tan útiles; a James McCluskey, Alexandra J. Corbett y Bronwyn S. Meehan el hacernos llegar desde el otro extremo del mundo los tetrámeros de MR1. En este sentido, cabe también agradecer a las instalaciones centrales de tetrámeros del NIH el proporcionarnos los tetrámeros de CD1 y aquellos necesarios para detectar linfocitos T OT-I y HY. Además, aunque no tuvimos tiempo de emplear los mismos en el transcurso de la realización de esta tesis, no quiero dejar pasar mi agradecimiento a John Wherry, Erietta Stelekati y a Michel J. Bevan por donarnos sin la más mínima reserva las distintas cepas de LCMV y *Listeria monocytogenes*. Y finalmente, aunque hay muchos que me dejó en el tintero, reconocer a Dan H. Barouch y Pablo Peñaloza-MacMaster su inestimable ayuda con los experimentos de *Listeria monocytogenes*.

A Manolo y al departamento de Inmunología de la UCM, quiero agradecer la oportunidad que me brindaron para realizar mi tesis.

Al Dr. Tsokos le reconozco su apoyo con el proyecto durante el comienzo y el final de mi estancia en Boston, Harvard y el Beth Israel Deaconess Medical Center. Gracias a que accedió a apoyar al Dr. Crispín cuando éste me invitó a unirme a su grupo, pude formar parte de un gran laboratorio, en el cual hice muy buenos amigos, viví buenos momentos y disfruté

como un “enano” de hacer ciencia e investigación en un entorno que hasta entonces no imagina posible.

Consecuentemente, igualmente aprecio mucho toda la ayuda y consejos de Betty, Nicoles y todos los miembros de la división de Reumatología, así como de Vasili, John y Ginny del servicio de citometría.

Mi vida en Boston no hubiese sido tan memorable sin haber conocido a los miembros del “Winchester Palace”, hogar donde finalmente hubiese pasado varios años sin mudarme disfrutando del “freakismo” y la cultura “nerd” en su definición más pura, de haber podido extender mi estancia en Estados Unidos.

Remontándonos atrás en el tiempo, incluso más allá de una década, y aunque muchos pensarán que tanto reconocimiento no es necesario, me gustaría dar las gracias a mis maestros y profesores, no a todos claro está, sino a los buenos (Julia, Margarita Salas, Mery, Juan Carlos, Carmen Angulo, Pilar, Iñigo, Carmen Rúa,...), por todo lo que me enseñaron. Tiene en este grupo particular importancia María, porque no sólo fue una maestra; fue y es una amiga que confió y me ayudó a creer en todo lo que soy capaz de hacer.

Y aunque en referencia a un periodo relativamente corto, pero crucial en mi vida científica, quiero mencionar el apoyo y los consejos, y la continuada amistad de Santos, Emilia, Paz y Meritxell, y en general de los integrantes de los departamentos de Inmunología y de Fisiología Animal de la Universidad Complutense de Madrid, y del departamento de Inmunología y Oncología del CNB. Y dentro de ambos, he de resaltar la compañía de Ali, Ara y Andrea, cuya amistad valoro profundamente y espero seguir conservando por mucho tiempo. Además, de mi tiempo en el Master de la UAM, conservo la amistad de MJ, Ángel y Carol, con quienes reí muchas tarde y noches y a los que espero pronto poder ver juntos de nuevo.

En este viaje temporal, no quiero olvidarme de todos esos amigos que me han acompañado y regalado sonrisas y buenos momentos: Patricia, Noemi, Arminda, Victoria, Ana, Noemí, Beatriz, Dani, Isa, Celia, Estefanía, Virginia, Dani, Víctor, Sara y muchos otros de los que seguro mi mente con principio de Alzheimer se ha olvidado momentáneamente.

Si de amigos se trata, Boston, no hubiese sido ese hogar y experiencia inigualable que fue sin la amistad de Jasmin, Cara, Devon, Megan y amigos. Me enseñaron lo que era ser hípster y un “New englander”, a celebrar el día “Pi”, a disfrutar del relieve de Vermont y New Hampshire y a pasar instantes únicos en cabañas en medio del bosque. Asimismo, quiero recordar aquí a Vero, esa gran fotógrafa y amiga que migró a lares más fríos; a Christian Hedrich y su humor alemán; a Michael y Peter, amigos del “laboratorio de al lado”; a Tran, por ser a la par la pequeña Mowgli y el “Honey Badger”, y Esra (junto a Lev y Roei), porque aunque llegó al laboratorio algo más cerca de mi partida de Boston, fue y es un apoyo y una muy buena amiga. No obstante, no puede faltar aquí Burçu; a ti, sencillamente, gracias por tu amistad y momentos compartidos.

Volviendo momentáneamente a tiempos más cercanos, me gustaría dar las gracias a los miembros del departamento de inmunología y reumatología del INCMNSZ y el laboratorio

Crispín-Rosetti. En especial al Doctor Alcocer por sus opiniones y siempre traer algo de humor “by de coffee” en las mañanas; a Janette, por sus buenos días, su ayuda y su sonrisa, a Giovanna, Alejandro y Marce por sus “mexicanadas” y ayuda en el laboratorio. Y a Nash, o como la conocemos allí, mamá Nash, por toda la ayuda con el papeleo, su incansable sonrisa y una amiga con la que hablar.

Y si, esto sigue, así que recomiendo encarecidamente a aquellos que estén principalmente interesados en el contenido científico de la tesis, los cuales espero que seáis muchos, que avancéis sin remordimiento unas cuantas páginas. Si bien hasta ahora todas las personas que he mencionado son especiales, los que siguen son los verdaderos ganadores de los premios a mejor(es) actor(es) protagonista(s) y de reparto.

Dos grupos de mejores amigos (sí, ya sé que muchos opinan que no se pueden tener muchos mejores amigos, pero en este caso, me guardo el privilegio de ser la excepción que confirma la regla) son una constante en mi vida y si bien a ellos les debo mucho, no acabaría nunca de mencionar “grandes” memorias y agradecerles todo lo que por mí han hecho. El primero de ellos, a quienes agradezco el estar siempre ahí, los “Tipiquillos”: Guillermo, por haber estado ahí desde aquel día en que aparecí medio desnudo y llorando en tu casa cuando era un crío; Manuel, por perdonarme que no le votase como delegado y por esa voz con la que nos deleita a todos; Óscar, por esas tardes jugando a la Nintendo 64, a los “playmovil”, y por ser el mejor compañero que existe para estirarse; Cristina por su “me congratula” y ser la mejor compañera de piso que se puede tener; “Helen” con su genio (y cariño inmensurable) madrileño: gracias por ofrecerme tu amistad instantánea con ese “Night’s on Fire”; Fabiola, por ser Fatu, y Esti por ser Tichu: no saben cuanta alegría me da cada vez que regreso a Las Palmas y me voy a tomar una cervecita con ustedes. A todos agradeceros vuestro sustento y amistad; esos momentos festivaleros y de convivencia. Os quiero (bueno, “les quiero”, no vayamos a matar a un baifo).

El segundo grupo al que me refería es el de “Biólogos por el Mundo”. Como para “los Tipiquillos” y las demás personas que mencionare a más abajo, aquí no puedo expresar tanto como me gustaría cuanto significan estos “Biólogos” para mí y cuan agradecido les estoy. A Estrella, por su amistad y su positividad; a Sandra, por venir siempre que la he necesitado, por esas rosas y ese chocola; a Giaco, porque por mucho que te de una palmadita al felicitarte por tu cumpleaños, sabes cuánto te quiero; a Lucía, por haberme enseñado cual era “mi pueblo” en la España peninsular, por todo el apoyo con la tesis y por el “vamos que no somos Noé”; a “Elf”, por mucho, pero lo cual resumiré de forma “atemporal” en nuestras últimas conversaciones: “Doctooooor”, y a Eugenia, por ser “the Freckles Queen” y mi socia en “Nogenia S.L.”. A todos ustedes, en conjunto y por separado, muchas gracias.

Sin importar la distancia que nos separe, quiero plasmar el cariño y agradecimiento enormes que tengo por mi “familia” de Boston. Christina, Lina, Sócrates y Maritina. Esta última por su sonrisa y los tres anteriores, porque llamarles amigos es poco. Sin vosotros, esos instantes, esas risas y esos cafés en Starbucks, toda la ciencia de Harvard no hubiese valido de nada.

Aunque a ellos no los incluyo como “familia” de Boston, puesto que vienen de España, Xiana, Abel y Paula fueron otro gran pilar de mi vivencia bostoniana. No solamente son grandes amigos a los que echo mucho de menos, si no que a ellos les debo una gran deuda de apoyo moral y “habitacional” en mis últimos días en “Gringolandia”.

Si bien comenzaron a ser parte de mi “familia bostoniana”, José, Florencia, Julieta y, incluyendo ahora, Puffy y familia (Edda, Beatriz, el Gordo...), siguen siendo mi “familia” y amigos mexicanos. México no sería mi hogar sin ellos y nunca podré devolverles ni agradecerles suficientemente todo lo que han hecho por mí aquí. Flore, José y Juli: no saben cuánto afecto les tengo y lo gran amigos que son. Gracias.

Además de la apreciación anterior como amigo al que tengo mucho cariño y estima, quiero agradecer a José, ahora como en su faceta de doctor Crispín, ser el mejor jefe y mentor que un estudiante de doctorado puede desear: por la motivación, las discusiones sobre ciencia y por la aterradora pero fructífera libertad y confianza que me diste para decidir el camino de mi proyecto. Gracias a ti, será mi yo científico del futuro.

A Daniel, sinceramente gracias por haber aparecido de improvisto en mi vida y por empezar a construir un camino juntos (y porque sé que no me arrepentiré de poner estas palabras indelebles aquí).

A mi hermana, porque llanamente “se la quiere fleje” y es una de las personas más importante en mi vida.

A mi padre, por siempre sacarme una sonrisa con sus comentarios y locuras y por haberme apoyado en todas mis decisiones, aunque no las compartiese; tienes mi cariño.

A mi madre, porque a pesar de que los destinos fuesen lejos de casa, lejos de ti, siempre me impulsaste a volar y ser mi mejor yo, mi “feliz” yo. No sabes cuánto te quiero y te lo agradezco.

Y a los tres, porque son la mejor familia que uno podría desear, discusión y peleas inclusive. Los quiero.

En definitiva, con estos agradecimientos tan irreverentes, poco formales, no tan emotivos como originalmente ideé, y quizá algo extensos, pero definitivamente incompletos, simplemente quería expresar mi inmensa gratitud a todas estas personas. Así que de nuevo, humildemente...

...Gracias

ÍNDICE

Abreviaturas.....	1
Resumen.....	7
Summary.....	15
I. Introducción.....	23
El linfocito T.....	27
Tolerancia inmunitaria	31
Tolerancia central	31
Tolerancia periférica	34
Modelos para estudiar mecanismos de tolerancia del sistema inmune	37
Co-receptor CD8.....	42
Función de CD8.....	43
Control de la expresión de CD8.....	45
Células T CD4 ⁻ CD8 ⁻ doble negativas: una población menor de linfocitos T	52
Ontogenia de las células T doble negativas.....	55
Linfocitos T doble negativas como células supresoras	62
Linfocitos T doble negativas como células pro-inflamatorias y autorreactivas	65
Señalización en células T doble negativas	70
¿Qué es lo que nos falta por considerar?	73
II. Hipótesis y Objetivo	79
III. Publicaciones	85
Capítulo 1.....	87
Capítulo 2.....	103

IV. Discusión.....	121
V. Conclusiones generales	153
VI. Bibliografía.....	165
VII. Anexos	197

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Mecanismos de tolerancia	36
Figura 2. Control de la expresión de <i>Cd8</i>	48
Figura 3. Tipos de linfocitos T	54
Figura 4. Desarrollo de células T doble negativas	61
Publicaciones	85
Capítulo 1	87
Figura 1	91
Figura 2	92
Figura 3	92
Figura 4	93
Figura 5	93
Figura 6	94
Figura S1.....	97
Figura S2.....	98
Figura S3.....	99
Figura S4.....	100
Capítulo 2.....	103
Figura 1	107
Figura 2	108
Figura 3	109
Figura 4	110
Información suplementaria figura 1.....	115

Información suplementaria figura 2.....	116
Figura 5. Tolerancia, autoinmunidad y agotamiento.....	139
Figura 6. Señalización de las células T doble negativas	143
Figura 7. Causas de la acumulación de srDNT/DN PD-1 ⁺	145
Figura 8. Vías de formación y características de las srDNT/DN-PD-1 ⁺	149

ABREVIATURAS

A:

Ab/mAb: monoclonal Antibody (anticuerpo monoclonal)

ADN: Ácido Desoxirribonucleico (DNA en inglés)

Ag: Antígeno

AIRE: Autoimmune Regulator (Regulador autoinmune)

ALPS: Autoimmune Lymphoproliferative Syndrome (Síndrome Linfoproliferativo Autoinmune)

ANOVA: Analysis of variance (Análisis de la varianza)

APC: Antigen-Presenting Cell (Célula presentadora de antígeno)

ARN: Ácido Ribonucleico (RNA en inglés)

B:

BCL2: B-Cell Lymphoma 2

BCR: B Cell Receptor (Receptor de células B)

BTLA: B- and T-lymphocyte attenuator

C:

cAMP: cyclic Adenosine Monophosphate (Adenosina monofosfato ciclico)

CBF- β : Core-Binding Factor- β

CD: Cluster of Differentiation (clúster de diferenciación)

CFSE: Carboxyfluorescein succinimidyl ester

CLP: Common Lymphoid Progenitor (Progenitor linfoide común)

CNS: Conserved Non-Coding Sequence (Secuencia no codificante conservada)

ConA: Concanavalina A

cTEC: cortical Thymic Epithelial Cell (Célula epitelial de la corteza del timo)

CTL: Cytotoxic T Lymphocyte (Linfocito T citotóxico)

CTLA-4: Cytotoxic T-lymphocyte associated protein 4

CREM: cAMP Responsive Element Modulator (Modulador del elemento de respuesta a cAMP)

Abreviaturas

D:

DAMP: Danger-Associated Molecular Pattern (Patrón molecular asociado a peligro)

DC: Dendritic Cell (Célula dendrítica)

DHS: DNase I Hypersensitive Site (Sitio de hipersensibilidad de la DNAsa tipo I)

DN: Double Negative (Doble negativa)

DNMT: DNA metiltransferasas

DP: Double positive (Doble positiva)

DTH: Delayed-Type Hypersensitivity (Hipersensibilidad de tipo retardado)

E:

EAE: Experimental Autoimmune Encephalomyelitis (Encefalomiелitis alérgica/autoinmune experimental)

ERK: Extracellular signal-regulated kinase

F:

FACS: Fluorescence-Activated Cell Sorting

G:

GF: Germ-Free

GFP: Green Fluorescent Protein (Proteína fluorescente verde)

H:

HAT: Histone Acetyltransferase (Acetil transferasa de histonas)

HDAC: Histone Deacetylase (Histona deacetilasa)

HSC: Hematopoietic Stem Cell (Célula madre hematopoyética)

I:

IEL: Intraepithelial Lymphocyte (Linfocito intraepitelial)

IFN: Interferón

IL: Interleukin (Interleucina)

IL-2R/IL-7R/IL-23R: Receptor de interleucina 2/7/23

iNKT: invariant Natural Killer T cell (Célula T invariante de tipo NK)

ITAM: Immunoreceptor tyrosine-based activation motif

J:

JIA: Juvenile Idiopathic Arthritis (Artritis idiopática juvenil)

K:

KO: Knock out (“eliminado”)

L:

LAG3: Lymphocyte-activation gene 3

LAT: Linker of activation of T cells

LCK: Tyrosine-protein kinase LCK/ Leukocyte C-terminal Src kinase

LCMV: Lymphocytic Choriomeningitis Virus (Virus de la coriomeningitis linfocítica)

LEF-1: Lymphoid Enhancer Binding Factor 1, codificado por *Lef1*

LES: Lupus Eritematoso Sistémico

LFA-1: Lymphocyte function-associated antigen 1

LM-OVA: *Listeria monocytogenes* expresando OVA

LN: Lymph Nodes (Ganglios linfáticos)

LPS: Lipopolisacárido

M:

MAIT: Mucosal-Associated Invariant T cell (Célula T invariable asociada a mucosa)

MFI: Mean Fluorescence Intensity (Intensidad de fluorescencia media)

MHC: Major Histocompatibility Complex (Complejo principal de histocompatibilidad)

mOVA: membrane-bound OVA

mARN: ARN mensajero

mTEC: medullary Thymic Epithelial Cell (Célula epitelial de la médula del timo)

mTOR: mechanistic/mammalian Target Of Rapamycin

N:

NALT: Nasal-Associated-Lymphoid Tissue (Tejido linfoide asociado a mucosa nasal)

NK: Natural Killer (Asesina natural)

NOD: Non-Obese Diabetic

NZB/W: New Zealand Black/White

O:

OVA: Ovoalbúmina de huevo de gallina

P:

Abreviaturas

PAMP: Pathogen-Associated Molecular Pattern (Patrón molecular asociado a patógenos)

PBMC: Peripheral Blood Mononuclear Cells (Célula mononuclear de sangre periférica)

PCR: Polymerase Chain Reaction (Reacción en cadena de la polimerasa)

PD-1: Programmed cell Death 1

PD-L1: Programmed cell Death-Ligand 1

PD-L2: Programmed cell Death-Ligand 2

PKC: Protein Kinase C (Cinasa C de proteínas)

pMHC: péptido-MHC

PMA: Phorbol-12-Myristate-13-Acetate (Acetato de forbol miristato)

PTPN22: Protein Tyrosine Phosphatase, Non-Receptor Type 22

R:

RAG: Recombination-Activating Gene

RIP: Rat Insulin Promoter

RTE: Recent Thymic Emigrant (emigrante tímico reciente)

ROR- γ t: RAR-related orphan receptor γ t

ROS: Reactive Oxygen Species (Especies reactivas de oxígeno)

RUNX3: Runt Related Transcription Factor 3

S:

SCA-1: Stem Cell Antigen 1

SEM: Standard Error of the Mean (Error estándar de la media)

SLAM: Signaling Lymphocytic Activation Molecule

SLE: Systemic Lupus Erythematosus

SLPA: Síndrome Linfoproliferativo Autoinmune

SP: Single positive (Sólo positiva)

SPF: Specific Pathogen Free

srDNT: self-reactive Double Negative T cell (Célula T doble negative autorreactiva)

SS: Síndrome de Sjögren

SYK: Spleen tyrosine kinase (Cinasa de tirosinas de bazo)

T:

TCF-1: T-Cell-Specific Transcription Factor 1, codificado por *Tcf7*

TCR: T Cell Receptor (Receptor de células T)

Teff: Célula T efectora

TGF: Transforming Growth Factor (Factor de crecimiento transformante)

THPOK: T-Helper-Inducing POZ/Krueppel-Like Factor, C-Krox

TIGIT: T-cell immunoreceptor with Ig and ITIM domains

TIM-3: T-cell immunoglobulin and mucin domain-containing protein 3

Th: T helper cell (Célula T cooperadora)

TLR4: Toll-Like Receptor 4

Tmem: Célula T de memoria

TNF: Tumor Necrosis Factor (Factor de necrosis tumoral)

Tr1: type 1 regulatory T cell (Célula T reguladora de tipo 1)

TRA: Tissue-Restricted Antigen (Antígeno de expresión restringida a tejido)

Treg: regulatory T cell (Célula T reguladora)

TSP: Thymic Seeding Progenitor (Progenitor que ceba al timo)

V:

VIH: Virus de la Inmunodeficiencia Humana

Z:

ZAP-70: zeta chain–associated protein kinase 70

Resumen |

Origen y Caracterización de los Linfocitos TCR- $\alpha\beta^+$ CD4 $^-$ CD8 $^-$ Doble Negativos en relación a su posible naturaleza autorreactiva

Introducción: Las enfermedades autoinmunes como el lupus eritematoso sistémico (LES), el síndrome de Sjögren (SS) o el síndrome linfoproliferativo autoinmune (SLPA) se caracterizan por la presencia en sangre periférica de una proporción anormalmente elevada de linfocitos T carentes de CD4 y CD8 (TCR- $\alpha\beta^+$ CD4 $^-$ CD8 $^-$; a partir de ahora referidos como doble negativos, DN). Estas células también forman parte de los infiltrados leucocitarios observados en los órganos diana de las respectivas enfermedades. Asimismo, modelos murinos asociados a estas enfermedades presentan un incremento de una población de linfocitos T fenotípicamente similar. En ambos casos estas células T presentan propiedades pro-inflamatorias pero se desconoce si desempeñan un papel importante en la etiología y patología de las enfermedades autoinmunes.

Varias evidencias sugieren que estos linfocitos pueden representar células T autorreactivas en dichas enfermedades y que podrían derivar de células T CD8 $^+$ previamente activadas. Esta población también ha sido asociada con una función supresora como células T reguladoras. No obstante, en condiciones fisiológicas, esto es, en individuos sanos, donde estos linfocitos pueden observarse como una fracción nimia de las células T, se ignora cuál es el origen y naturaleza de estos linfocitos T DN.

Objetivos: Con base a lo anterior, nuestro objetivo en este trabajo fue investigar el carácter autorreactivo de las células T DN en modelos murinos, prestando especial atención a su ontogenia a partir de linfocitos T activados, expresión de moléculas y marcadores que puedan definir subpoblaciones celulares, y sus propiedades pro- o anti-inflamatorias.

Resultados: En el capítulo 1 utilizamos dos modelos de ratón caracterizados por la expresión de TCR transgénicos restringidos por moléculas MHC de clase I, TCR OT-I y TCR HY, y la respuesta de las células T que poseen estos TCR al encontrar el antígeno específico (respectivamente la ovoalbúmina, OVA -en ratones mOVA-, y una proteína expresada exclusivamente en ratones macho, Smcy) presentado como antígeno propio o como antígeno exógeno asociado a una infección. En primer lugar, cuando los linfocitos T con TCR transgénico se desarrollan en ratones que expresan los respectivos antígenos específicos como autoantígenos, se observa que entre la población de linfocitos autorreactivos hay un incremento considerable de células T DN. Complementariamente, mediante la transferencia de linfocitos T CD8⁺ OT-I o HY a ratones que expresan el autoantígeno, observamos que las células T CD8⁺ se activan, proliferan y pierden la expresión de CD8 convirtiéndose en linfocitos T DN. No observamos lo propio en el caso de células T CD4⁺ que expresaban el receptor OT-II al transferirlos a recipientes que expresaban el antígeno específico, ovoalbúmina, como propio. Asimismo, no se producía la formación y acumulación de linfocitos T DN cuando las células T CD8⁺ respondían a su antígeno administrado con un adyuvante (Alum[®]) o formando parte de un patógeno (*Listeria monocytogenes*). Los linfocitos T DN derivados de células T CD8⁺ autorreactivas (self-reactive Double Negative T cell, srDNT) fueron incapaces de proliferar bajo estimulación mediante TCR y CD28, se caracterizaban por la expresión de niveles elevados de HELIOS y PD-1, presentaban la capacidad potencial de producir significantes cantidades de IL-17A e IFN- γ , y no mostraron características de células reguladoras. Complementariamente, empleando ratones RIP-mOVA, que expresan OVA únicamente en riñón y páncreas, reportamos que la conversión a DN solamente ocurre en aquellos tejidos donde se expresa activamente el autoantígeno. Finalmente, para excluir que las srDNT se formasen únicamente debido a un artefacto derivado del uso de TCR

transgénicos, comprobamos que linfocitos T DN que expresaban HELIOS y PD-1 se generaban asimismo con mayor frecuencia a partir de un repertorio policlonal de células T CD8⁺ (pero no células T CD4⁺) enriquecido en células autorreactivas (ratones deficientes de *Aire*).

En el capítulo 2, sirviéndonos de los resultados observados en el capítulo 1, definimos y estudiamos la naturaleza de las células T DN en ratones C57BL/6 (B6) tratando de identificar varias subpoblaciones y de determinar su naturaleza autorreactiva. Observamos que la población de células TCR- $\alpha\beta$ ⁺ DN en ratones adultos (8-12 semanas de edad) podían separarse en PD-1⁻ y PD-1⁺. La población PD-1⁺ no se componía de células NKT ni MAIT, se localizaba preferentemente en el bazo (en comparación a los ganglios linfáticos) y expresaba mayores niveles de HELIOS que la contraparte PD-1⁻. Si bien ambas subpoblaciones, PD-1⁻ y PD-1⁺, se definían por un fenotipo activado (alta expresión de CD44), las DN PD-1⁺ expresaban niveles incrementados de CD122 (IL-2R β), CD11a (LFA-1), y CD43, y carecían de la expresión de CD69, CD25 (IL-2R α), CD127 (IL-7R α), CD62L y Ly-6C, fenotipo que en su conjunto es sugerente de la activación de las células T derivada del reconocimiento de antígeno específico y exposición crónica al mismo, y que los linfocitos T DN PD-1⁺ compartían con los linfocitos T DN derivados de células CD8⁺ autorreactivas. En general, los linfocitos T DN presentaban elevados niveles de producción de citocinas pro-inflamatorias y de transcritos codificantes para moléculas relacionadas con Th17. En concreto, las células T DN PD-1⁺ tenían alta expresión de ROR- γ t y mayor concentración de mRNA para *Il17a* que la población PD-1⁻. Estas células PD-1⁺ dependían de moléculas de MHC de clase I para su desarrollo, como se deduce de una deficiencia en las mismas en ratones carentes de moléculas MHC clase I (β 2 microglobulina^{-/-}). Por el contrario no se veían influenciadas por la ausencia de microbiota. Su proporción se incrementaba en modelos murinos de autoinmunidad, en ratones con defectos en procesos de tolerancia inmune, lo que nuevamente apoya su identidad como

células autorreactivas. Dicha naturaleza autorreactiva se demostró en los linfocitos T DN PD-1⁺ (pero no en la población PD-1⁻) mediante el análisis *ex vivo* de la expresión de GFP en células T de ratones Nur77-GFP, una cepa donde la expresión de GFP es proporcional a la intensidad con la que el TCR reaccione contra un antígeno, de forma que niveles elevados de GFP denotan encuentro con antígeno específico.

Conclusiones: De los resultados obtenidos en este trabajo pueden extraerse las siguientes conclusiones:

1. Las células T CD8⁺ pueden perder la expresión de CD8 cuando se activan por su antígeno específico presentado como autoantígeno en tejidos periféricos.
2. Los linfocitos T CD8⁺ autorreactivos se convierten en una población de células T DN al encontrar antígeno específico exclusivamente en aquellos tejidos donde éste es expresado.
3. La conversión hacia linfocitos T DN parece no observarse en células T CD4⁺ autorreactivas.
4. La conversión de linfocito T CD8⁺ a DN con la asociada pérdida de CD8 ocurre de forma particular cuando el antígeno se presenta como propio y no ocurre cuando el mismo antígeno específico se encuentra asociado a adyuvantes o a patógenos.
5. Los linfocitos T DN derivados de células T CD8⁺ autoreactivas se caracterizan por la expresión de PD-1 y HELIOS. Este fenotipo es compartido con una población de células T DN encontradas en el bazo de ratones sanos y no manipulados

6. Los linfocitos srDNT adquieren la capacidad de expresar cantidades importantes de IL-17A, no muestran un fenotipo supresor y son refractarias a la proliferación inducida por estimulación a través de TCR.
7. Las células T DN PD-1⁺ muestran un fenotipo muy similar al de las células srDNT y poseen una mayor capacidad de producir citocinas pro-inflamatorias.
8. Estos linfocitos T DN PD-1⁺ representan una población celular con identidad propia, separada de células NKT y MAIT.
9. Los linfocitos DN PD-1⁺ constituyen un grupo de linfocitos autorreactivos como indica el hecho de que han sido activados (expresión de GFP en ratones Nur77-GFP) al reconocer su antígeno específico como antígeno endógeno, no derivado de metabolitos de la microbiota.

Summary |

**Ontogeny and Phenotype of TCR- $\alpha\beta$ ⁺CD4⁻CD8⁻ Double Negative T lymphocytes with
regards to their self-reactive nature**

Introduction: Autoimmune diseases such as systemic lupus erythematosus (SLE), Sjögren's syndrome or autoimmune lymphoproliferative syndrome (ALPS) are characterized by the presence of an abnormally increased proportion of T lymphocytes lacking CD4 and CD8 expression (TCR- $\alpha\beta$ ⁺CD4⁻CD8⁻; henceforth called double negative, DN) in peripheral blood. DN T cells can be found also infiltrating the target organs affected in each of these diseases. Likewise, murine models emulating these syndromes show a higher percentage of a phenotypically similar T lymphocyte subset. In both cases, these T cells display pro-inflammatory properties but it is unclear whether they play an important role in the onset and pathology of autoimmunity.

Several lines of evidence suggest that these lymphocytes may be self-reactive T cells increased in these autoimmune conditions and that they may derive from CD8⁺ T lymphocytes that have been previously activated. Such population has been also ascribed a suppressor function as regulatory T cells. However, in homeostasis, this is, in healthy individuals, where these lymphocytes represent a small fraction of total peripheral T cells, the origin and the cellular nature of DN T lymphocytes still needs to be characterized in depth.

Aims: Based on this, the main aim of this dissertation was to investigate the self-reactive condition of DN T cells in murine models, with special regards to their ontogeny from activated T lymphocytes, expression of molecules and markers that can define cell subsets, and their anti- or pro-inflammatory properties.

Results: In the first section (chapter 1), we studied two models of MHC class I-restricted TCR transgenic mice (OT-I and HY), and the T cell response of lymphocytes bearing these TCRs upon cognate antigen encounter (ovalbumin -mOVA mice- and a protein exclusively expressed in male individuals) presented as self or as foreign antigen associated to an infection. First, when T cells bearing the transgenic TCR developed in mice that express their respective cognate antigen as self, one can observe that among the self-reactive T cell population there is a significant increase in DN T cells. In the same line, in adoptive transfer experiments of HY and OT-I CD8⁺ T lymphocytes into recipients expressing the self-antigen, we observed that CD8⁺ T cells were activated, underwent proliferation and lost CD8 expression becoming DN T lymphocytes. We did not observe the same process when we transfer CD4⁺ T cells that bear the ovalbumin-reactive TCR OT-II into mice that expressed ovalbumin as self-antigen, despite de activation and proliferation of CD4⁺ T cells. DN T lymphocytes did not appear and accumulate when CD8⁺ T cells responded to their cognate antigen injected with adjuvant (Alum[®]) or as a pathogen-associated protein (*Listeria monocytogenes*). Self-reactive CD8-derived DN T cells (srDNT) were unresponsive upon TCR/CD28 stimulation, expressed high levels of HELIOS and PD-1, produced high amounts of IL-17A and IFN- γ , and did not show any suppressor capacity *in vitro*. By adoptive transferring CD8⁺ OT-I T cells into RIP-mOVA mice, with OVA expression restricted to the pancreas and the kidney, we demonstrated that conversion to DN T cells only occurred were antigen was actively being produced. Finally, we showed that srDNT with a similar phenotype accumulated more frequently from a polyclonal T cell repertoire of CD8⁺ (but not CD4⁺) cells enriched in self-reactive T cells.

In the second chapter, relying on the results we observed in the first section, we defined and study the phenotype of DN T cell in C57BL/6 mice, trying to identify subsets and determine their self-reactive nature. We observed that TCR- $\alpha\beta^+$ DN cells in adult mice (8-12 weeks old) could be separated in PD-1 $^-$ and PD-1 $^+$. The PD-1 $^+$ subpopulation did not contain MAIT or NKT cells, was localized preferentially to the spleen (compared to lymph nodes) and expressed higher levels of HELIOS than the PD-1 $^-$ subset. While both populations were characterized by an activated phenotype, PD-1 $^+$ DN T cells expressed increased levels of CD122 (IL-2R β), CD11a (LFA-1) and CD43. They lacked CD69, CD25 (IL-2R α), CD127 (IL-7R α), CD62L and Ly-6C, phenotype suggestive of chronic antigen-dependent exposure and shared with DN T lymphocytes derived from self-reactive CD8 $^+$ T cells. In general, DN T cells displayed elevated levels of pro-inflammatory cytokine production and mRNA coding for Th17-related molecules. Particularly, PD-1 $^+$ DN T cells expressed higher ROR- γ t and *Il17a* mRNA than the PD-1 $^-$ counterpart. These PD-1 $^+$ cells relied on MHC class I molecules for their ontogeny since they were reduced in MHC class I deficient mice (β 2 microglobulina $^{-/-}$). On the contrary, their development and phenotype was unaltered by the absence of microbiota. Their proportion was increased in autoimmune murine models, in mice with defects in T cell tolerance. We demonstrated the self-reactive nature of PD-1 $^+$ DN T lymphocytes (opposite to the PD-1 $^-$ population) by analyzing *ex vivo* the GFP expression in T cells from Nur77-GFP mice, a mouse strain where GFP expression is proportional to TCR-antigen interaction strength, in a way that elevated expression of GFP is equivalent to cognate antigen encounter.

Conclusions: From the results that we obtained in this work, we can conclude that:

Summary

1. CD8⁺ T cells can lose CD8 expression when they are activated by the encounter of cognate antigen presented as self in peripheral tissues.
2. Self-reactive CD8⁺ T lymphocytes become DN T cells upon recognition of cognate antigen exclusively in those tissues where antigen is being actively synthesized.
3. This process does not seem to be detected in self-reactive CD4⁺ T cells.
4. The CD8⁺ T lymphocyte to DN T cell conversion and the loss of CD8 particularly follows after cognate antigen is presented as self and does not occur when the same antigen is associated to adjuvants of pathogens.
5. Self-reactive CD8⁺ T cell-derived DN T lymphocytes are identified by the expression of PD-1 and HELIOS. This phenotype is similar to that of a subset of DN T cells found in the spleen of unmanipulated healthy mice.
6. srDNT acquire the capacity to express important amounts of IL-17A, do not show suppressor properties and are refractory to TCR-induced proliferation.
7. PD-1⁺ DN T cells display a phenotype very similar to that of srDNT and have the potential to produce pro-inflammatory cytokines.
8. These PD-1⁺ DN T lymphocytes represent a distinct population different from MAIT and NKT cells.
9. PD-1⁺ DN T lymphocytes are self-reactive T cells because they have been activated upon encounter with cognate antigen presented as self and not derived from microbiota metabolites.

I. Introducción

El sistema inmunitario tal y como lo entendemos en animales vertebrados representa un sistema finamente regulado que permite una interacción equilibrada de los organismos con su entorno. Su principal función es proteger a los organismos de posibles invasiones de microorganismos y parásitos como es el caso de virus, bacterias o helmintos (esto es, patógenos) que puedan amenazar o comprometer la homeostasis y supervivencia de los primeros. De forma reduccionista, se podría decir que el sistema inmune tiene la capacidad de discernir entre componentes propios del organismo de aquellos que son foráneos y evitar la colonización por o mediar la eliminación de estos últimos. De hecho, si bien esta definición de sistema inmunitario se aplicaba originalmente para animales vertebrados, en base a recientes descubrimientos, este concepto puede extenderse a otros grupos filogenéticos, desde el reino vegetal hasta varios grupos de bacterias y arqueas (*Archaea*). No obstante, los vertebrados han desarrollado el sistema inmune más complejo y sofisticado que se conoce y que no sólo sirve como mecanismo de defensa, sino como un sistema de comunicación entre diversos órganos y con las comunidades microbianas que nos rodean¹⁻⁴.

Debido a la presión evolutiva, el sistema inmunitario derivó en dos facetas intercomunicadas que protegen al organismo de posibles peligros ambientales: el sistema de inmunidad innata y el sistema de inmunidad adaptativa. El sistema inmunitario innato está formado por las barreras epiteliales y mucosas, células mieloides como macrófagos y células dendríticas (DC) y ciertos tipos de linfocitos innatos. Conforman la primera línea de defensa contra patógenos y se caracteriza por su capacidad de responder en cuestión de horas. Esto es posible gracias a receptores codificados en la línea germinal que reconocen señales de estrés asociadas a daño celular (DAMPs, de sus siglas en inglés “damage-associated molecular pattern”) y moléculas asociadas a patógenos (PAMP, o “pathogen-associated molecular

pattern”) cuya expresión es compartida por muchos microorganismos y activan a las células inmunitarias con objeto de eliminar la fuente de dichas señales⁵.

La inmunidad innata detiene la expansión de la mayoría de las infecciones a todo el organismo. Sin embargo, cuando los patógenos son capaces de romper la protección proporcionada por la respuesta inmunitaria innata, se activa el sistema inmune adaptativo. Si bien a medida que avanzamos en el conocimiento del sistema inmunitario las delimitaciones que distinguen lo innato de lo adaptativo se vuelven difusas (p. ej. células NK -por sus siglas en inglés “natural killer”- o macrófagos con la capacidad de adquirir memoria inmune, o ciertos tipos de células T preparadas para responder como células innatas), el sistema inmune adaptativo se compone principalmente de distintos tipos de linfocitos y se caracteriza por su especificidad hacia patógenos, el potencial de atacar a todo virtual patógeno y el desarrollo de memoria inmunológica para amenazas ya encontradas previamente. En sí es una división del sistema inmunitario más dinámica, probablemente debido a que evolucionó para proporcionar a los organismos vivos con un mecanismo más adaptable y adecuado a la presión que imponen patógenos en constante evolución y cambio que puedan escapar al escrutinio de la inmunidad innata². El sistema inmunitario adaptativo está integrado por los linfocitos B y T. Ambos poseen un tipo receptor de membrana único, capaz de reconocer fragmentos (llamados antígenos) de virtualmente cualquier macromolécula que pueda ser sintetizada por un organismo. Aunque dichos receptores, llamados receptores de células B y de células T (BCR y TCR, respectivamente por sus siglas en inglés), derivan de distintos genes, ambos están compuestos de dos subunidades o cadenas proteicas distintas. La característica que hace especial a estos receptores es que son sintetizados a partir de fragmentos reorganizados estocásticamente de los genes que codifican para estas cadenas. Esto, junto con algunos mecanismos adicionales, permite que cada linfocito tenga un receptor único,

prestando así al sistema inmune de una plétora de diferentes receptores para cualquier antígeno posible⁶.

Dentro del sistema inmunitario adaptativo, las células B clásicamente se consideran las responsables de terciar la respuesta humoral (mediante la secreción de anticuerpos), mientras que los linfocitos T montan la respuesta celular⁷.

El linfocito T

Los linfocitos T son elementos imprescindibles de la inmunidad adaptativa ya que además de atacar directamente células tumorales y microorganismos extraños, coordinan la respuesta inmune a través de la producción de factores solubles como las citocinas y quimiocinas. La población de linfocitos T engloba a su vez varios subgrupos de células con funciones distintas. Los dos subtipos o linajes principales son los linfocitos T CD⁺8 (“cluster of differentiation”) o citotóxicos (“cytotoxic T lymphocytes” o CTL), especializados en matar patógenos, células infectadas y células tumorales, y los linfocitos T CD⁺4, compuestos a su vez por linfocitos T cooperadores (Th, del inglés “T helper”) y T reguladores (Treg) y que coordinan la respuesta tisular y del sistema inmune durante una infección. También existen subtipos menos frecuentes de células T como es el caso de los linfocitos T $\gamma\delta$, las células T invariantes asociadas a mucosa (MAIT, por sus siglas en inglés: “mucosal-associated invariant T cell”) y las células T invariante de tipo NK (iNKT de “invariant Natural Killer T cells”), que participan en la respuesta inmune adaptativa como soporte a las células T convencionales (CD⁺4 y CD⁺8), o en situaciones donde éstas no pueden responder.

Toda célula T depende de su TCR para reconocer su antígeno específico y en consecuencia activarse de forma específica (ciertas citocinas y otros receptores también pueden inducir un cambio fisiológico y metabólico en los linfocitos, pero este no se considera

específico). El TCR está conformado por dos subunidades que se asocian con cadenas CD3 ϵ , γ , δ y ζ y ensamblan el complejo CD3/TCR que es capaz de transducir el reconocimiento antigénico en una cascada de señalización intracelular. La cadena de TCR α (codificada por *Tcra*) se empareja con la cadena β (*Tcrb*) formando el TCR- $\alpha\beta$, presente en la mayoría de las células T (células T $\alpha\beta$), mientras que una subpoblación menor de linfocitos T presenta un TCR compuesto de una cadena γ y otra δ (y por ello llamadas células T $\gamma\delta$)⁸. Aunque algunos TCR son capaces de reconocer moléculas del complejo principal de histocompatibilidad (MHC, “major histocompatibility complex”) en combinación con lípidos y otros metabolitos distintos de péptidos, el ligando más extendido para el TCR es MHC propios con oligo-péptidos acoplados procedentes de la degradación de proteínas (llamado en su conjunto pMHC)^{9,10}.

Al igual que el resto de células hematopoyéticas, los linfocitos T derivan de células madre hematopoyéticas de médula ósea (hematopoietic stem cell, HSC). Éstas, tras diferenciarse hacia progenitores linfoides comunes (CLP, de sus siglas en inglés, common lymphoid progenitor) y luego en TSP (de sus siglas thymic seeding progenitor), colonizan el timo y se comprometen hacia el linaje de células T^{11,12}. En el timo, estos progenitores (a partir de ahora llamados timocitos) experimentan un proceso de minuciosa educación tímica hasta que emergen del timo como emigrantes tímicos recientes (RTE). Finalizan su maduración como células T vírgenes y migran a órganos linfoides secundarios como el bazo y los ganglios linfáticos^{13,14}. En base a la expresión de los receptores CD8 y CD4, los timocitos maduran pasando por una etapa inicial de doble negativos (DN) para a continuación expresar ambos receptores como timocitos doble positivos (DP) y finalmente expresar solamente uno de los dos positivos únicos (SP, del inglés “single positive”). Durante esta “educación” tímica, los timocitos adquieren TCRs capaces de reconocer con baja afinidad péptidos propios asociados a MHC endógenos en un proceso llamado selección positiva. La principal desventaja que se

deriva de las potencialmente infinitas posibilidades de TCR a formar es que junto a TCR que reconozcan antígenos exógenos, los timocitos sintetizan TCRs que reconozcan antígenos propios o auto-antígenos. Para eliminar la presencia de TCR autorreactivos, tras la selección positiva, los timocitos son forzados a pasar un proceso de tolerancia central o selección negativa: aquellos clones de células T que tengan TCR que reconozcan pMHCs propios con alta afinidad serán programados para muerte celular. De forma alternativa, algunos de estos timocitos autorreactivos se diferenciarán hacia subtipos de linfocitos T autorreactivos que no impliquen peligro para tejidos propios como es el caso de las células Treg, que de manera adicional, cumplen un papel protector¹⁵⁻¹⁷. Tanto los linfocitos T CD4⁺ como CD8⁺ se desarrollan de manera similar de los mismos precursores y, aunque todavía es un tema controvertido, lo que determina que un timocito se dirija bien hacia el linaje CD4 bien hacia el CD8 es el reconocimiento de un péptido unido a MHC de clase II o MHC de clase I, respectivamente^{18,19}. Una vez se comprometen a uno de ellos, las células CD4 y CD8 se diferencian de forma importante en su programa transcripcional y función.

Las células T CD4 son mediadores de inmunidad protectora y autoinmunidad. Aunque algunos linfocitos T CD4 muestran potencial citotóxico²⁰, la mayoría de células CD4 se diferencia durante una respuesta inmune hacia uno de los varios subtipos de células T cooperadoras (Th1, Th2, Th9, Th17 y Th22), siendo esto determinado por el tipo de infección y señales ambientales y caracterizándose cada uno de ellos por la producción de un determinado tipo de citocinas y factores de transcripción específicos de cada tipo: p. ej. las Th2 secretan interleucinas (IL)-4, IL-5 e IL-13, todo ello controlado por GATA3, y las células Th17 producen IL-17, IL-21, IL-22 y su factor de transcripción característico es ROR- γ t²¹. Así, las células CD4 vírgenes se convertirán en células T foliculares cooperadoras (T_{FH}) que apoyaran a las células B en la respuesta humoral y células efectoras Th1²². Por otra parte,

algunas clases de células CD4 llamadas Tregs controlan la amplitud de la respuesta inmunitaria y aquellas reacciones contra antígenos propios que puedan aparecer en el individuo. Tregs CD4⁺FOXP3⁺ y células T reguladoras tipo 1 (Tr1) son esenciales para acotar las respuestas autoinmunes. Aunque ambas poblaciones son necesarias y suficientes para evitar la colitis e inflamación intestinal, en otras condiciones su papel no es redundante como demuestra la observación de que déficits de cualquiera de las dos poblaciones se asocia con patologías autoinmunes murinas y humanas. Las células Tr1 dependen mayoritariamente de la producción de IL-10 y TGF- β para ejercer su actividad supresora²³, mientras que las Tregs FOXP3⁺, además de ser capaces de producir citocinas antiinflamatorias, son capaces de controlar la disponibilidad de IL-2 o la sinapsis inmune entre linfocitos T y DCs entre otros mecanismos^{24–27}.

Aunque los linfocitos T CD8⁺ pueden clasificarse análogamente a como ocurre en células CD4⁺ en células citotóxicas (Tc) de diferentes subtipos (Tc1, Tc2, Tc17,...), esta división no se encuentra demasiado extendida y estos linfocitos son considerados de forma general como linfocitos T citotóxicos (CTL) debido a su predominante función en inducir la muerte de otras células (ya sea células infectadas o células neoplásicas)^{28–30}. Los CTLs generan mayoritariamente interferón (IFN)- γ y factor necrótico tumoral (TNF) de forma que activan la respuesta a interferón contra virus patógenos en células infectadas (con objeto de destruir al patógeno) y no infectadas (de manera que pueda protegerse de la infección). Regulan la amplitud de la activación y muerte de linfocitos T a través de la vía del receptor de muerte FasL/Fas, así como mediante el uso de perforinas, granulinas y granzimas³¹, las cuales también son empleadas para atacar patógenos y células tumorales. Paralelamente, algunos linfocitos T CD8⁺ se sirven de estos mecanismos para suprimir la respuesta inmune actuando como células reguladoras³².

A pesar de que estas dos subpoblaciones (linfocitos CD8⁺ y CD4⁺) conforman el grueso de células T y median la mayoría de las respuestas inmunitarias (contra patógenos pero también contra antígenos ajenos inocuos y, en ocasiones, antígenos propios), como ya mencionamos existen otros subtipos de células T que desempeñan funciones importantes ya sea participando activamente en la respuesta inmune, ya sea regulándola.

TOLERANCIA INMUNITARIA

La tolerancia central, aquella que ocurre durante la formación de las células T en el timo, es uno de los pilares principales para evitar la autoinmunidad, ya que mediante ella se elimina el grueso de células T autorreactivas que generadas durante la reorganización y formación del TCR³³. No obstante, linfocitos T autorreactivos están presentes en ratones y humanos sanos y sin signos de autoinflamación^{34–37}. En individuos sanos, estas células poseen un fenotipo no responsivo^{35,36} y aunque su abundancia se consideraba nimia, estudios recientes han propuesto que las células T selectivas para ciertos antígenos propios son tan frecuentes como células vírgenes para antígenos exógenos³⁵ y su existencia conlleva un riesgo de autoinmunidad asociado, si estas células inducen daño inflamatorio tisular y la producción de autoanticuerpos³⁸.

Tolerancia Central (Figura 1)

Cuando las TSP entran en el timo, comienzan a transformarse y diferenciarse en una serie de estadios celulares consecutivos y alternativos que darán lugar a los distintos tipos de linfocitos T, estando cada una de estas etapas caracterizada por un perfil de expresión génica

y la expresión de ciertas moléculas de membrana¹¹⁻¹⁴. El TSP progresará a ETP (“early thymic progenitor”)/timocito DN1 y de ahí a DN2a, DN2b y a continuación DN3, estadios identificados por la expresión de c-Kit, CD44 y CD25. En esta etapa la célula DN3 puede comprometerse al linaje de linfocitos T $\gamma\delta$, previa transición por timocito DN4³⁹, o dirigirse hacia el linaje de linfocitos T $\alpha\beta$, al recombinar el locus de *Tcrb*, y comenzar a expresar la cadena β del TCR junto con la cadena pre-TCR α ⁶. Esto ocurre principalmente en la corteza del timo donde los timocitos carecen de CCR7 y reconocen MHC cargado con péptidos endógenos procesados por el timoproteasoma y presentado por cTECs (cortical thymic epithelial cell)^{40,41}. Durante este proceso los timocitos adquieren la expresión de CD4 y CD8, convirtiéndose en DP y es entonces cuando reorganizan su cadena *Tcra*. Si son capaces de sintetizar una cadena α de forma que produzcan un TCR- $\alpha\beta$ que reconozca pMHC endógenos, serán seleccionados positivamente. De lo contrario, morirán por negligencia, es decir, por ausencia de señal del TCR que induzca factores anti-apoptóticos (“death by neglect”)^{14,18,42-44}. En este proceso adquieren la expresión de CCR7, se convierten en timocitos DP y posteriormente SP, y migran hacia la médula del timo donde experimentarán los procesos más cruciales para evitar respuestas autoinmunes. Por una parte, la mayoría de los timocitos que reaccionen intensamente contra antígenos propios, presentados por varios tipos celulares y diferentes contra los que fueron seleccionados positivamente^{40,45}, serán eliminados en el proceso de selección negativa, proceso mediado principalmente por la inducción de la proteína pro-apoptótica BIM y que puede ser identificado por la elevada expresión de CD5, NUR77, HELIOS, PD-1 o caspasa 3 activa^{44,46,47}.

Alternativamente, las células autorreactivas, particularmente las pertenecientes al linaje CD4, pueden sobrevivir y divertirse hacia una de las varias poblaciones autorreactivas que no suponen un riesgo autoinmune o que incluso promueven la tolerancia inmunitaria:

células MAIT, NKT, CD8 $\alpha\alpha$ o FOXP3⁺ Tregs^{15,48–52}. Todos estos procesos son afectados por la competencia entre los distintos timocitos, la abundancia y tipo de factores solubles como las citocinas^{53–56}.

Dos factores son imprescindibles para el desarrollo y función del timo: AIRE (“Autoimmune regulator”) y FOXP1^{43,57}. La selección negativa ocurre principalmente en la región medular del timo, donde linfocitos B, DC residentes o que migran desde tejidos periféricos, y células epiteliales de la médula del timo (mTEC, “medullary thymic epithelial cells”) presentan autoantígenos ubicuos y restringidos a determinados tejidos (TRA, “tissue-restricted antigen”) para eliminar los timocitos autorreactivos o re-direccionarlos hacia Tregs. Este proceso de eliminación/educación de células potencialmente patogénicas, y la habilidad de presentar TRAs es dependiente de AIRE, y de FEZF2, otro factor de transcripción que recientemente ha sido identificado como componente complementario a AIRE^{57–64}. La expresión de TRA dependiente de AIRE requiere de la señalización de RANK/CD40 mientras que la dependiente de Fezf2 depende de LT β R. Además parece que se encargan de la presentación antigénica mediada por mTECs de proteínas presentes en distintos tejidos con cierto solapamiento: AIRE controla, por ejemplo, antígenos expresados en páncreas, ojos, piel y pulmón, mientras que Fezf2 controla aquellos propios de cerebro, intestino, riñón, etc. En el caso de AIRE, éste actúa en concierto con otros factores de transcripción y proteínas para promover la expresión de TRAs⁶⁵. AIRE y FOXP1, además, son esenciales para la ontogenia y función de las mTECs y por lo tanto para su función como selectoras negativas de timocitos^{43,66}, y en particular FOXP1 parece también ser requerido para el desarrollo de cTECs y la expresión de timoproteasoma^{67,68}.

Así, mediante esta cadena de procesos, dependiendo de la célula que presente el antígeno, del nivel y extensión de la expresión del mismo, y del linaje celular, los clones de

células T autorreactivas serán eliminados en el timo, ignorados en la periferia o parcialmente ignorados y redirigidos hacia el linaje de Tregs^{69,70}.

Tolerancia Periférica (Figura1)

Debido a que células T autorreactivas escapan la selección negativa en el timo, existen una multitud de mecanismos, tanto intrínsecos a la célula T como extrínsecos a ella, que mantienen la homeostasis del sistema⁷¹⁻⁷³. En condiciones generales, una célula T requiere de tres señales para ser propiamente activada: la señal 1, proporcionada por el complejo TCR/CD4 o CD8 reconociendo pMHC específicos; la señal 2, en forma de co-estimulación a través de receptores como CD28, OX-40 (CD134, TNFRSF4) o CD27, y por último la señal 3, integrada por citocinas que promueven la expansión y crecimiento de los linfocitos T. Todas ellas son proporcionadas durante respuestas inmunes a patógenos, licenciando a las células T a proliferar para contrarrestar el origen de dicho antígeno y diferenciarse en células efectoras (Teff) y de memoria (Tmem)⁷². Cuando una célula autorreactiva interactúa con su antígeno específico en tejidos linfoides y no linfoides periféricos, en condiciones de normales las señales 2 y 3 están ausentes y en consecuencia el linfocito T es “tolerizado” (se vuelve tolerante hacia su antígeno). Aunque existen varios mecanismos que inducen tolerancia y son comunes para células CD4⁺ y CD8⁺, ambas poblaciones pueden sufrir procesos de tolerancia exclusivos y es por ello que nos centraremos aquí en aquellos descritos para linfocitos T CD8.

Las células Tregs y las DC juegan un papel crítico en la inducción de tolerancia periférica. De hecho, en presencia de una tolerancia central intacta, defectos en la homeostasis de células T derivados de deficiencias en las Treg permiten la acumulación de linfocitos T autorreactivos y en última instancia el desarrollo de patología

autoinmunitaria^{25,26,74,75}. Asimismo, las DC controlan refinadamente si una célula CD8⁺ será activada, se volverá no responsiva o será eliminada (tolerancia por muerte). De hecho, clásicamente las células CD8 autorreactivas son suprimidas y eliminadas al interactuar con antígenos específicos propios, ello mediado por presentación cruzada (del inglés “crosspresentation”) de dicho antígeno por DC tolerogénicas de forma dependiente de BIM/CD95^{76–78}. Alternativamente, en función de la localización, la forma de presentación y la concentración del antígeno, las células autorreactivas pueden sencillamente mantener un fenotipo virgen e ignorar la presencia del auto-antígeno^{70,79}.

Aunque la definición tradicional de anergia hace referencia a linfocitos T CD4⁺⁸⁰, las células CD8⁺ autorreactivas pueden entrar en un estado similar en el que no pueden responder al encontrar su antígeno específico pero tampoco se vuelven apoptóticas. Este estado “tolerante” se identifica por un “paisaje transcripcional” característico que impone una baja producción de citocinas y un estrecho control de la proliferación celular^{81,82}.

A causa del potencial peligro que suponen las células T reactivas contra antígenos propios, varias parejas de receptores-ligando con función inhibitoria presentes en linfocitos T-células presentadoras de antígeno (APC) se encargan de inducir tolerancia y mantener a las células autorreactivas acotadas^{83,84}. LAG3 (“Lymphocyte-activation gene 3”), TIGIT (“T-cell immunoreceptor with Ig and ITIM domains”) y TIM-3 (“T-cell immunoglobulin and mucin domain-containing protein 3”) son receptores supresores importantes cuya alteración se ha asociado con procesos autoinmunes y que son dianas terapéuticas potenciales para re-vigorar a células T “agotadas” (del inglés “exhausted”), que pierden su capacidad de respuesta en

enfermedades crónicas y en cáncer^{85,86}. PD-1 (“Programmed cell death 1”, CD279, codificado

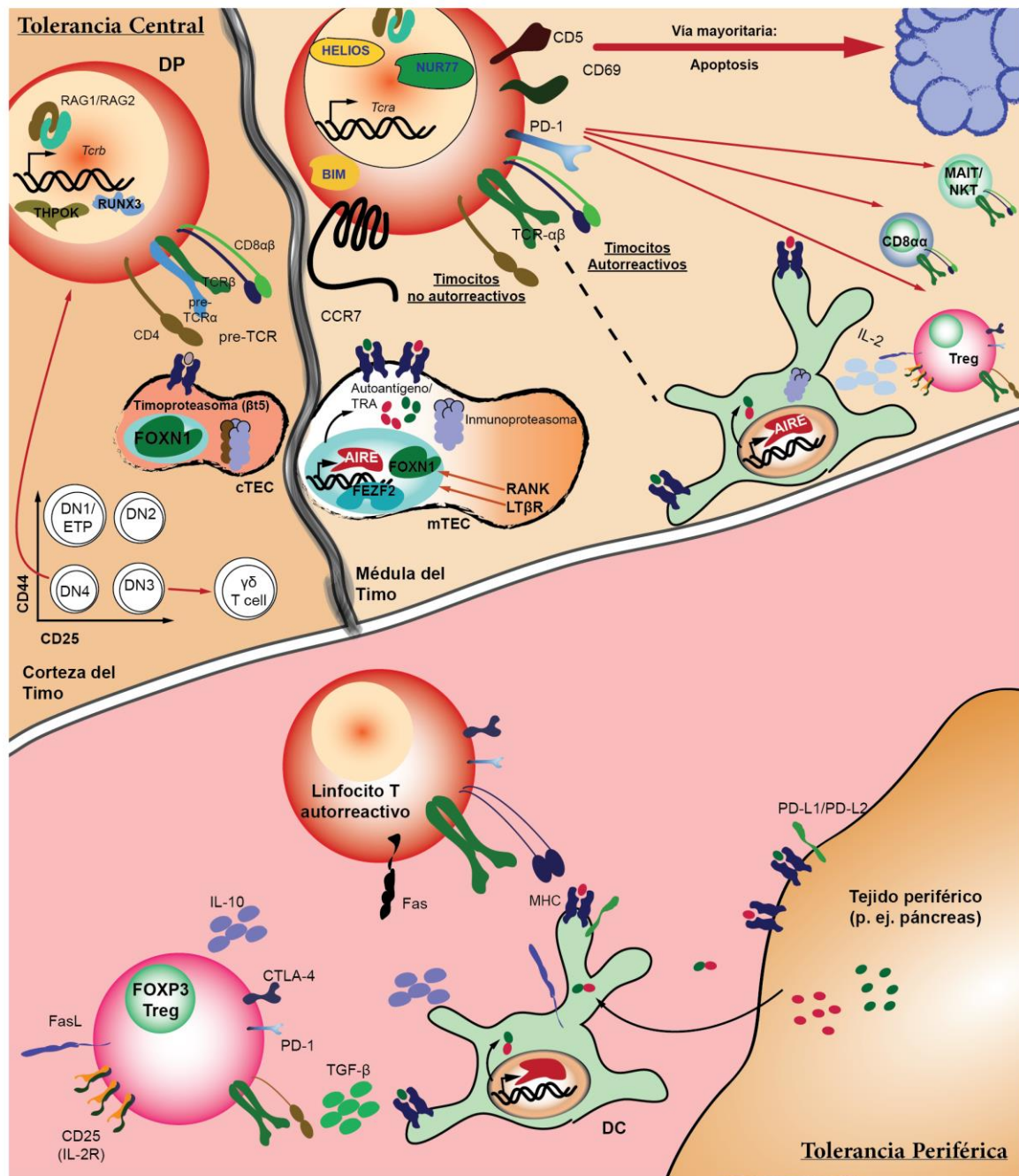


Figura 1. Mecanismos de tolerancia. Tras comenzar a expresar el pre-TCR, los timocitos son seleccionados positivamente por las cTECs de forma que puedan reconocer antígenos en el contexto de MHC endógeno. Posteriormente, en la médula son monitoreados para educar a aquellos que reconozcan con demasiada afinidad/avidez antígenos propios. Este proceso, mediado por mTECs, de células B y DCs, se compone de la selección negativa, donde timocitos autorreactivos son eliminados mediante apoptosis, y de un proceso educativo donde son redirigidos hacia el linaje de Treg. En caso de que la selección negativa no sea eficiente al 100%, en la periferia, Tregs y DCs, junto con la expresión de ligandos para receptores inhibitorios (p. ej. PD-L1/PD-L2) en casi todos los tejidos, constituyen un segundo filtro para evitar la aparición de respuestas autoinmunes.

por *Pcdcl1*) y CTLA-4 (“Cytotoxic T-lymphocyte associated protein 4”, CD152, codificado por *Ctla4*) representan dos de los principales receptores inhibitorios que han sido mejor caracterizados hasta la fecha y cuya deficiencia desencadena síndromes autoinmunes^{87,88}. Ambos son expresados en linfocitos T autorreactivos^{36,89} e inducen tolerancia en condiciones homeostáticas. Sus ligandos PD-L1 (B7-H1, CD274) y PD-L2 (B7-DC, CD273), y CD80 y CD86, respectivamente, se expresan en células hematopoyéticas y en tejidos periféricos. Aunque vía diferentes cascadas de señalización, tanto PD-1 como CTLA-4 inhiben y modulan la migración y motilidad de los linfocitos y regulan a la baja las señales procedentes del TCR y receptores co-estimuladores para evitar la expansión de células T^{83,90–93}. En relación a este papel, un trabajo reciente sugiere que las enfermedades autoinmunes se definen por un deterioro generalizado en la inducción de agotamiento de células T que en condiciones fisiológicas regularía la activación de linfocitos T CD8⁺ autorreactivos⁹⁴.

Modelos para estudiar mecanismos de tolerancia del sistema inmune

Aunque es importante comprender como el sistema inmune funciona en condiciones naturales, esto es, en organismos que se desarrollan en un ambiente cambiante, plagado de microorganismos y sujeto a ciertas “amenazas”⁹⁵, el estudio y el conocimiento de la fisiología de cualquier sistema biológico requieren modelos reduccionistas y herramientas que nos permitan delinear los procesos que participan en la fisiología y metabolismo de los seres vivos. Para este propósito se han desarrollado distintos abordajes mediante el desarrollo de reactivos y metodología, creación de líneas celulares y manufactura de cepas de ratones transgénicos o deficientes en ciertas proteínas. De esta forma, la eliminación de un gen en determinadas células puede ser informativa de la función del mismo; la expresión de una

proteína fluorescente bajo el control del promotor de determinado gen permite estudiar qué células y en qué momento se expresa dicho gen, o la sobre-expresión de una proteína modificada puede ayudarnos a comprender su función o la de uno de sus dominios funcionales en un proceso celular.

En Inmunología, para el estudio de células T se han desarrollado múltiples modelos y cepas de ratón para lograr lo anteriormente descrito. Una de las primeras herramientas ingeniadas fue la creación de ratones transgénicos para el TCR. Tras aislar un clon de linfocito T CD8⁺ o CD4⁺ cuya reactividad se conoce o interesa estudiar, se clona su TCR mediante técnicas generales de biología molecular y se introduce en embriones murinos para lograr una cepa cuyos linfocitos T expresen preferencialmente dicho TCR. Así se generaron, entre otros, los ratones con TCR transgénicos OT-I y HY, específicos para un péptido contenido en la ovoalbúmina de huevo de gallina (OVA) y presentado por la molécula MHC de clase I H-2K^b, o un antígeno derivado de la proteína Smcy codificada en el cromosoma Y en el contexto de H-2D^b, respectivamente^{96,97}. Debido a que al expresarse un TCR en la superficie de un timocito en desarrollo, se produce un proceso de exclusión alélica que impide la expresión de los otros alelos que codifican para *Tcra* y *Tcrb* (o en este caso, ambos alelos endógenos), la mayoría de los linfocitos T observados en tejidos periféricos presentan el TCR transgénico en su superficie. No obstante, el momento de expresión del TCR es de vital importancia para un desarrollo normal de los timocitos. En este sentido, ambas cadenas de los TCR transgénicos se expresan durante el estadio de timocito DN3, forzando una expresión temprana de la cadena del TCR α , lo cual puede dar lugar en cierta situaciones a fenotipos anormales^{47,98,99}. En condiciones normales, donde estos TCR no son específicos para autoantígenos, las células T se desarrollan con aparente normalidad. Paralelamente, se generaron cepas que contenían linfocitos B con BCR transgénicos¹⁰⁰, o células T CD4⁺ con TCRs con especificidad para aquellas proteínas

contras las que se activaban los linfocitos T CD8⁺, de forma que pudiesen estudiarse respuestas inmunes mediadas por linfocitos T CD8⁺, linfocitos T CD4⁺ o analizar la relación entre ambas¹⁰¹.

Con el desarrollo de ratones con clones de linfocitos T que podían reconocer antígenos concretos y cuya respuesta inmune y cinética estaban bien caracterizadas *in vitro* e *in vivo* (llamados por esta razón antígenos modelo), se comenzaron a crear cepas de ratones en las que estos antígenos eran expresados bajo promotores de determinados genes, de forma que solamente se sintetizaban en ciertos tejidos: ratones RIP-mOVA, que expresan OVA en el páncreas y riñón, o ratones K14-mOVA/OVAp, que expresan esta proteína en queratinocitos^{70,102–104}. Esto permitió, y permite, analizar el papel de las células T en enfermedades de tipo autoinmune como la diabetes o GVDH, y los mecanismos asociados. Del mismo modo, se han generado o identificado virus y bacterias que expresan antígenos modelo o variantes de los mismos de forma que pueda estudiarse la respuesta inmune en infecciones subóptimas o crónicas, y en relación a mimetismo molecular y el desarrollo de autoinmunidad^{34,105–107}. La relación entre la respuesta inmune, la autoinmunidad y la microbiota se ha investigado con la utilización de ratones libres de microbiota (“germ-free”, GF) o con cocteles de antibióticos que eliminan ciertos grupos de microorganismos^{107,108}. De este modo se ha observado que ciertas especies o comunidades de microorganismos predisponen a la inflamación o presentan antígenos bacterianos con una estructura muy similar a la de antígenos propios que ocasiona que las células T autorreactivas sorteen los mecanismos de tolerancia y promuevan la autoinmunidad (llamado por ello mimetismo antigénico).

Al igual que en otras disciplinas de la investigación biomédica, también se han creado y siguen creando (más incluso ahora con el desarrollo de CRISPR) ratones con deficiencia

(ratones “knock out”, KO) o sobre-expresión (bien generalizada, bien discreta) de ciertos genes¹⁰⁹. De este modo, los ratones deficientes de *Aire* (*Aire*^{-/-} o *Aire*KO) fueron críticos para descubrir el papel de este factor en la tolerancia inmune⁵⁷; la deficiencia específica de *Fzf2* en TECs corroboró el papel de esta proteína en la selección negativa de células T, más allá de su conocido papel en el sistema nervioso⁵⁸; la eliminación de *Rag1* y/o *Rag2* ayudó a comprender el requerimiento de estas enzimas en la síntesis del TCR y del BCR, y a generar ratones deficientes en células B y T permitiendo aseverar la necesidad de los linfocitos en la patología autoinmune¹¹⁰, y la sobre-expresión de *Bcl2* en células T y B fundamentó su papel anti-apoptótico y la necesidad de su inhibición al terminar la respuesta inmune y la eliminación de linfocitos autorreactivos¹¹¹.

De forma similar a los ratones “knock out” se han ingeniado ratones denominados reporteros que resultan de gran utilidad en Inmunología. Éstos expresan transgénicamente una molécula (p. ej. Thy1.1) o proteína fluorescente (p. ej. GFP) bajo el control de, o conjuntamente con un gen endógeno. Ratones IL-17A-GFP o IL-23R-GFP (que expresan GFP en aquellas células que producen transcritos de *Il17a*, o en lugar de expresar *Il23r*, respectivamente) han sido ampliamente utilizados en modelos de enfermedades autoinmunes como la esclerosis múltiple (encefalitis alérgica experimental, EAE) o la espondilitis anquilosante^{112,113}. Recientemente, una cepa que expresa GFP bajo el control del promotor de NUR77 (codificado por *Nr4a1*), ha sido ampliamente utilizada para cuantificar la intensidad con la que una célula T reconoce a un antígeno y detectar la activación de las mismas dependiente específicamente de TCR, así como para detectar timocitos en fase de selección positiva o negativa, y linfocitos autorreactivos^{44,49,75,100}.

Como una evolución de los TCR transgénicos, el desarrollo de tetrámeros de MHC ha permitido el estudio de la dinámica de la células T con determinada especificidad antigénica

en repertorios policlonales de linfocitos y la detección de células T autorreactivas en individuos sanos y pacientes^{35,36,114,115}. Los MHC son sintetizados por líneas celulares de forma que pueden aislarse con su conformación natural y posteriormente unirse entre sí mediante entrecruzamiento (p. ej. uniendo biotina a los MHC y ligando varios a una molécula de estreptavidina conjugada a un fluoróforo). Posteriormente estos tetrámeros (ya sean de MR1, MHC de clase I o de clase II) se cargan con los antígenos/péptidos cuya especificidad quiere detectarse entre los linfocitos T¹¹⁶ y se usan a modo de anticuerpos para teñir, por ejemplo, células de bazo o PBMCs. Esto permite detectar y seguir la respuesta inmune (expansión, proliferación, producción de citocinas, apoptosis, etc.) de linfocitos T a antígenos asociados a infecciones o procesos concretos^{117,118}.

De este modo, combinando varias metodologías de las aquí comentadas, se puede estudiar la respuesta de linfocitos contra la proteína fluorescente verde (GFP). Múltiples cepas de ratones y ciertos patógenos se han diseñado para expresar GFP; en consecuencia, la respuesta de las células T contra el GFP, ya sea como autoantígeno, ya sea como antígeno asociado a infección, podría analizarse. De hecho así ocurre gracias a la existencia de ratones con un TCR transgénico contra GFP¹¹⁹ y al uso de tetrámeros cargados con péptidos antigénicos contenidos en el GFP⁶⁹. Con todo ello, los mecanismos de tolerancia y el desarrollo de autoinmunidad pueden investigarse en distintas cepas de ratones que expresan GFP de manera ubicua o restringida a tejidos y órganos que puedan ser de interés, así como el efecto que ciertas infecciones pueden tener sobre éstos^{69,119}.

En definitiva, si bien es cierto que las condiciones y modelos que utilizamos en el laboratorio no reproducen exactamente lo observado en la naturaleza⁹⁵, es indudable que

todas la metodología y herramientas desarrolladas han permitido un estudio y comprensión profundos del sistema inmunitario.

CO-RECEPTOR CD8

El complejo de TCR se compone de varias moléculas ensambladas (subunidades CD3, que constituyen el módulo de señalización, y las cadenas α y β , que representan el módulo de reconocimiento) que permiten a la célula T reconocer complejos pMHC y traducir dicha interacción en una cadena de señalización río abajo del TCR. En algunos tipos de linfocitos T el TCR por sí solo es suficiente para reconocer el antígeno específico y activar a las células T (MAIT, iNKT, células T $\gamma\delta$). Sin embargo, la mayoría de las células T CD4⁺ y CD8⁺ convencionales necesitan de co-receptores para aumentar la avidéz del TCR y ser activadas al encontrarse con el antígeno. Estos co-receptores son las dos moléculas que respectivamente le dan nombre a dichas subcategorías principales de células T: las proteínas de membrana CD4 y CD8. El papel atribuido tradicionalmente a ambos receptores es el de potenciar las uniones TCR-pMHC y adosar a la sinapsis inmune la tirosin-cinasa específica de linfocitos de la familia Src p56^{lck} (LCK, “Lymphocyte cell specific tyrosin kinase”) encargada de la fosforilación de las cadenas de CD3 ζ y la iniciación de la señalización intracelular. A pesar de la extensa evidencia que existe en referencia a ello, aún se continua investigando sobre cómo estos co-receptores actúan exactamente para promover la discriminación entre diversos antígenos. Por ejemplo, CD8 es importante en la estabilización de los complejos pMHC-TCR mientras que CD4 no parece tener este rol¹²⁰. Sin embargo, puede que la función primera de CD8 (y por extensión de CD4) sea imponer que el TCR este restringido de forma general a reconocer antígenos presentados por MHC, más allá de la distinción entre MHC de clase I o clase II¹²¹. Tal es así,

que en ausencia de CD8 y CD4, otros ligandos distintos de pMHC pueden seleccionar positivamente TCR con características de reconocimiento antigénico parecidas a las de los anticuerpos (es decir, reconocen motivos estructurales en una molécula y no únicamente una secuencia lineal de péptidos derivada de una proteína).^{122,123}.

Función de CD8

CD8 es un heterodímero u homodímero que puede estar formado por una cadena α (CD8 α , codificada por *Cd8a*) y una cadena β (CD8 β , *Cd8b*) o por dos cadenas CD8 α . Ambas subunidades son glicoproteínas transmembrana pertenecientes a la familia de las inmunoglobulinas. Aunque comparten relativamente poca homología secuencial, su estructura terciaria es bastante similar¹²⁴; CD8 α y CD8 β se integran por un dominio extracelular capaz de interactuar con los dominios $\alpha 3/\alpha 2$ del MHC de clase I, una región transmembrana y un dominio citoplasmático, que en el caso de CD8 α recluta a la cinasa p56^{lck}¹²⁵. CD8 $\alpha\beta$ se encuentra en la mayoría de las células T CD8⁺ del timo y de la periferia, mientras que CD8 $\alpha\alpha$ se observa en células T CD8⁺ asociadas a mucosas y algunos linfocitos CD4 restringidos al aparato digestivo^{50,51,126,127}.

CD8 y el TCR cooperan de forma sinérgica para unirse a pMHC, de tal manera que CD8 aumenta la avidéz del TCR por pMHC¹²⁸. Adicionalmente, la presencia de CD8 facilita la discriminación entre péptidos similares pero que modifican la afinidad entre pMHC-TCR¹²⁹. La ausencia de CD8 puede no solo traducirse en falta de señal, sino que puede convertir la señal de un antígeno co-agonista en una señal inhibitoria que disminuya la activación del TCR (Stone et al., 2011). En términos de cinética de unión y unidades de afinidad, CD8 tiene una velocidad de asociación con el MHC de $1.4 \times 10^5 \text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$ mientras que el TCR se une a pMHC con 10^3 - 10^5M^{-1}

10^{-1} ^{130,131}. En el caso del ampliamente utilizado TCR transgénico 2C, la presencia de CD8 $\alpha\alpha$ incrementa la sensibilidad a péptidos 10-1000 veces lo que equivale a obtener respuestas similares con 100 nM sin CD8 y con 100 pM en presencia de CD8 $\alpha\alpha$. CD8 $\alpha\beta$ incrementa esta sensibilidad aún más aumentando la respuesta a antígenos 15 veces sobre la respuesta en presencia de CD8 $\alpha\alpha$, reduciendo el umbral de sensibilidad para detección del antígeno hasta 1 pM¹³². Resultados similares se han obtenido para otros TCRs como por ejemplo P14¹³³, donde la ausencia de CD8 disminuyó la avidéz del TCR por pMHC entre 4 y 14 veces. Sin embargo, y apoyando como función principal el papel de CD8 como promotor de la avidéz por pMHC más que su función como porteador de p56^{lck}, péptidos de mayor afinidad (un incremento de 3-4 veces) fueron suficientes para negar el efecto de la ausencia de CD8. Estos cambios de afinidad/avidéz se reflejaron además en la respuesta proliferativa, de señalización intracelular y de producción de citocinas asociadas a la activación del TCR^{133,134}.

In vivo, sin embargo, CD8 $\alpha\beta$ parece ser el co-receptor que realmente potencia la sensibilidad del TCR para reconocer pMHC. CTLs con una mayor proporción de CD8 $\alpha\beta$ que de CD8 $\alpha\alpha$ son más sensibles a ser activados a bajas concentraciones de péptido¹³⁵. De hecho, varios estudios sugieren que CD8 α puede desempeñar un papel regulador sobre CD8 $\alpha\beta$ al inhibir la interacción de éste con MHC^{124,125}. Aunque en hibridomas de células T, CD8 $\alpha\alpha$ eleva la avidéz del TCR¹³², en timocitos DP la expresión del homodímero no fue capaz de mediar la selección positiva ni permitir la activación del TCR al unir pMHC, al tiempo que se observó una reducción del flujo de calcio al sobre-expresar CD8 $\alpha\alpha$ ¹³⁶.

Además de aumentar la capacidad de unión del TCR a pMHC, como ya se mencionó, CD8 recluta a p56^{lck} y posiblemente a LAT ("Linker of activation of T cells) a la sinapsis inmunológica mediante un motivo Cx(x)C presente en CD8 α ^{120,137,138}. Aunque la mayoría de los datos indica que CD8 es el encargado de localizar ambas moléculas en proximidad al TCR,

ciertas observaciones indican lo contrario, esto es, que p56^{lck} y LAT son responsables de localizar a CD8 cerca del TCR. Tanto CD8 α como CD8 β pueden ser palmitoilados y en consecuencia atraídos hacia balsas lipídicas donde se asocian junto al TCR formando clúster o módulos de señalización^{130,139}. Aunque CD8 α es la subunidad que físicamente se une a p56^{lck} y LAT¹³⁷, CD8 β es la subunidad responsable de, una vez palmitoilada, asociar CD8/p56^{lck} con el complejo CD3/TCR^{140,141}. CD8 α no es capaz de hacer lo propio como homodímero y es CD8 β la subunidad que directamente interacciona con CD3 ϵ ¹⁴². La presencia de CD8 β es necesaria para potenciar la asociación de CD8 α con p56^{lck} y LAT y luego situarlas en proximidad al TCR^{137,138,143}. Adicionalmente, CD8 parece jugar un papel importante en el estado de pre-activación de p56^{lck}, debido a que CD8 interacciona con CD45, un receptor de membrana de tipo fosfatasa que activa a LCK (defosforilando el residuo Y505) y le permite fosforilar los motivos de activación o ITAMs (“Immunoreceptor tyrosine-based activation motif”) presentes en CD3 ζ ¹³⁰. Como consecuencia, ZAP-70 (“Zeta-chain-associated protein kinase 70”) se une a estos ITAMs fosforilados y propaga la vía de señalización que traduce la ocupación del TCR por pMHC en una respuesta intracelular. Ya sea el caso que LAT es atraído junto a CD8 al complejo de señalización, ya sea que sencillamente se asocia a ZAP-70 fosforilado, LAT permite el ensamblaje de otras proteínas que coordinan los eventos de señalización distales al TCR^{144,145}. La función óptima de CD8 parece también requerir cierto grado de maduración y la glicosilación de CD8¹⁴⁶ y la activación de CD8 por parte de p56^{lck} en dirección dentro-fuera que potencia la unión coordinada de pMHC-CD8/TCR¹²⁹.

Control de la expresión de CD8 (Figura 2)

Los niveles de expresión de CD4 y CD8 son susceptibles de modulación como puede observarse en la ontogenia de las células T. Empero, la expresión de CD8 parece ser más

sensible de ser regulada que la de CD4. Las señales derivadas de la interacción pMHC-TCR y de varias citocinas al unirse a sus receptores son los principales factores extrínsecos que controlan la expresión de CD8. En este sentido, la señalización por IL-7 junto con interacciones no específicas del TCR con pMHC endógenos regulan la expresión de CD8 y la avidéz del TCR de forma que promueve la homeostasis del grueso de linfocitos T CD8^{147,148}. Si bien el reconocimiento de pMCH por el TCR puede modular a la baja los niveles de CD8¹⁴⁷, esta interacción es asimismo esencial para preservar los mismos como indica la observación de que linfocitos CD8⁺ transferidos adoptivamente a ratones deficientes en MHC de clase I (ratones deficientes de $\beta 2$ microglobulina, $\beta 2mKO$ o $\beta 2m^{-/-}$) pierden la expresión de CD8 cuando se les priva de interacciones con pMHC^{149,150}. IL-7 es crucial en la supervivencia homeostática y necesaria para la regulación al alta de la expresión en superficie de CD8. De hecho, el TCR y el receptor IL-7R α (CD127) señalizan alternativamente para mantener los niveles de CD8 dentro de un rango adecuado: IL-7 promueve el aumento de la expresión de CD8 y en consecuencia, potencia la señal del TCR; una interacción superior entre pMHC y TCR disminuye los niveles de expresión de CD8 e IL-7R α , lo cual a su vez reducirá la intensidad de activación del TCR permitiendo la re-expresión de IL-7R α y que comience nuevamente el ciclo^{147,151}. IFN- γ e IL-4 también son capaces de regular los niveles de CD8. Durante la activación de la célula T, la presencia de IFN- γ mantiene constante la expresión de CD8. Por el contrario, IL-4 promueve la regulación a la baja del co-receptor¹⁵². En relación a la IL-4, su papel en el control de la expresión de CD8 es controvertido ya que otro estudio demuestra que al igual que la IL-7 y otras citocinas que señalan a través de la cadena común gamma (IL-2 e IL15), IL-4 contribuye al mantenimiento a la alta de la expresión de CD8¹⁴⁷. Sin embargo, tras ser activadas *in vitro* mediante PMA/Ionomicina o con anticuerpos contra CD3 y CD28 en presencia de IL-4, o *in vivo* en el caso de CTL dirigidas contra un tumor productor de IL-4, los

linfocitos CD8⁺ reducen significativamente la expresión de CD8 con aumento asociado de la metilación del locus de *Cd8*^{153–155}. Independientemente de las citocinas presentes en el medio, es claro que tras la activación celular a través del TCR, la expresión de CD8 se regula a la baja transitoriamente^{156,157}. Tanto *in vitro* como *in vivo*, las células CD8 disminuyen temporalmente su capacidad de unir tetrámeros de pMHC y de responder a antígeno específico. Contrario a la modulación por citocinas, donde existe cierto control a nivel transcripcional, la pérdida de CD8 sucede a nivel de superficie celular y no se observan cambios en la en la cantidad relativa de transcritos. Hay que notar que en esta última situación, la reducción en expresión de CD8 no fue únicamente intrínseca a la activación del TCR sino que también requería señales derivadas de IFN tipo I.

La expresión de CD8 es fuertemente controlada a nivel transcripcional, y aunque probablemente existe una regulación a nivel traduccional y de proteína, estos han sido menos explorados. *Cd8a* y *Cd8b* son regulados por cinco secuencias potenciadoras (a veces llamadas intensificadoras, del inglés “enhancers”) y varios factores de transcripción (TF) que determinan la expresión de CD8 durante diferentes estadios de diferenciación y activación de los CTLs^{19,158}. Los genes que codifican para CD8 α y CD8 β se encuentran ligados y físicamente cercanos en un locus de regulación conjunta que se extiende 36 kb (kilobases) en el ratón y 56 kb en el humano. En la regulación de la expresión del receptor CD8 $\alpha\beta$, el control de la transcripción de *Cd8a* es el que se encuentra mejor documentado. De hecho, puede que la región codificante y secuencias reguladoras para *Cd8a* sea el lugar donde mayor control se ejerce porque la expresión y transporte de CD8 β hacia la membrana celular es dependiente de la síntesis y presencia de CD8 α ¹⁵⁹, y en consecuencia, puede que la regulación de *Cd8a* sea suficiente para modular los niveles de CD8. Los elementos actuando en *cis* que controlan la expresión de *Cd8a* y *Cd8b* son los potenciadores E8I-E8V, activos en distintos tipos celulares

y momentos de la ontogenia de los linfocitos CD8⁺. E8I es activo en timocitos DP, SP CD8⁺, linfocitos T CD8⁺ vírgenes periféricos y linfocitos intraepiteliales (“intraepithelial lymphocytes, IELs) pero solo es indispensable para la expresión de CD8 en timocitos SP CD8⁺ e IELs. E8II y E8III se activan en los timocitos DP pero parecen ser prescindibles para la expresión de CD8 en células periféricas. E8IV también se encuentra activo en timocitos DP, pero interesantemente también en algunas células T CD4⁺. Aunque E8V no parece ser crítico por sí mismo para la expresión de CD8αβ en ningún momento del desarrollo de células T CD8⁺, se encuentra activo junto a E8I en timocitos DP. De esta forma la expresión de CD8 es regulada por actividad combinada de diversos potenciadores en diferentes momentos en lugar de por la activación secuencial de uno u otro. Ello se hace evidente en la heterogénea expresión de CD8 en timocitos DP de ratones deficientes simultáneamente para varios potenciadores: ratones que carecen de E8I/E8II, E8II/E8III y E8V no pierden completamente CD8 en ninguna población celular, pero en general cualquier grupo de células CD8⁺ tienen un espectro de

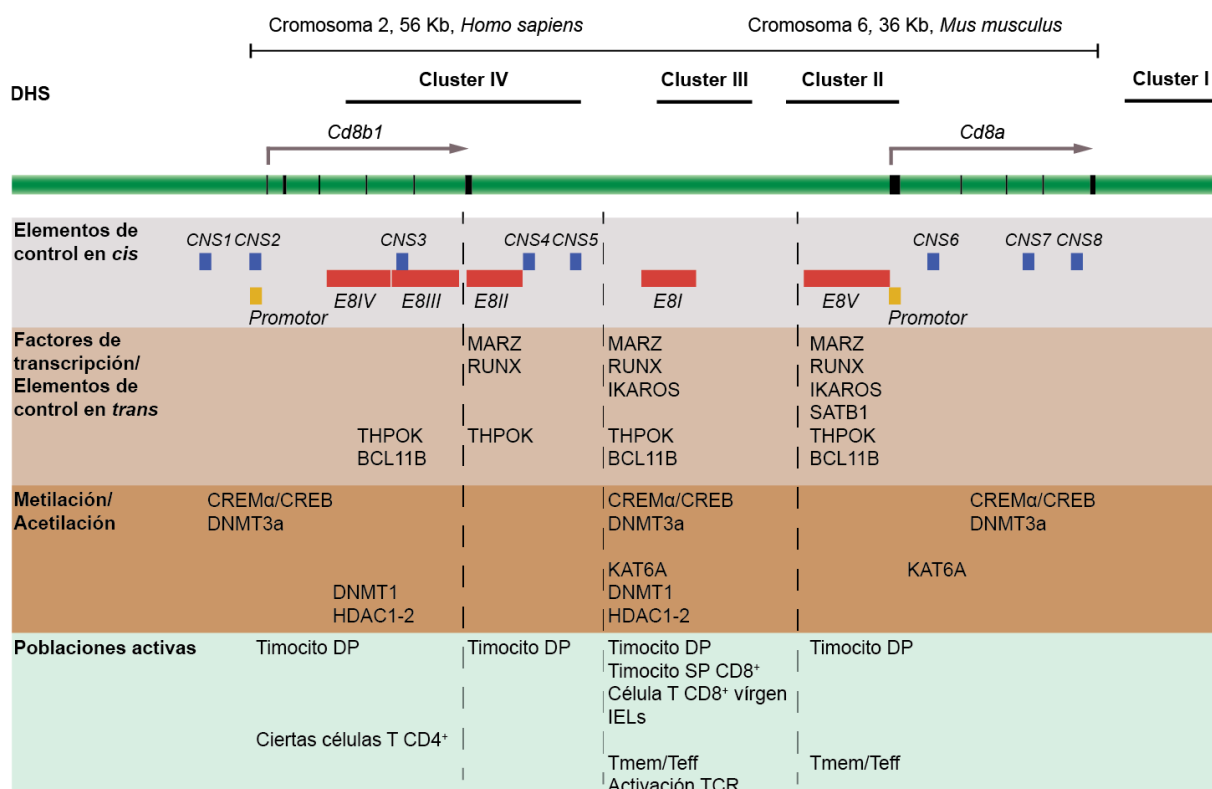


Figura 2. Control de la expresión de *Cd8*.

células con diferentes grados de expresión de CD8^{124,160}. Adicionalmente, E8I es imprescindible para el mantenimiento de los niveles de CD8 $\alpha\beta$ tras la activación de las células T y la formación de memoria^{159,161,162}.

La metilación del locus de *Cd8* (tanto a nivel de las histonas como del ADN) constituye un proceso importante en el control de la expresión de CD8 y el mantenimiento estable del linaje de las células CD8¹⁶³. Estudios de metilación de la región que codifica para *Cd8b1-Cd8a* demuestra que a pesar de estar transcripcionalmente inactivo, la historia de la expresión de CD8 puede ser inferida parcialmente estudiando el patrón de metilación¹⁵⁴. Esto lo ilustra el hecho de que las células CD4 muestran menor metilación del locus de *Cd8* en comparación a timocitos DN, incluso cuando hay expresión nula de ARN mensajero del CD8¹⁶⁴. Las ADN metiltransferasas (DNMT) 1, DNMT3a y DNMT3b se encargan de silenciar activamente ambos loci (*Cd4* y *Cd8*) mediante la metilación de islas CpG localizadas en regiones reguladoras. Ratones que carecen de las regiones potenciadoras E8I/E8II presentan deficiencias en la expresión de CD8 que se ven revertidas cuando DNMT1 es eliminada, sugiriendo que la metilación es un proceso empleado activamente en el control de la expresión de CD8 e indicando que E8I y E8II probablemente reclutan factores que abren el locus y contrarrestan la metilación del ADN¹⁶⁵. Asimismo, la acetilación del locus es necesaria para que se expresen CD8 α y CD8 β , ya que HDAC1 y HDAC2 son necesarias en células CD4 para suprimir la expresión de CD8, indicando que cuando se comienza a expresar CD8 en timocitos, la acetilación promueve la expresión de CD8¹⁶⁶.

Aunque la metilación es crucial en el control de la expresión génica¹⁶⁷, la acetilación (controlada por las acetil transferasas de histonas, HATs, y las deacetilasas de histonas, HDACs) y los TF son asimismo críticos para determinar la temporalidad y el grado de expresión

de un gen. La expresión de CD8 esta activamente regulada en fases tempranas del desarrollo de las células T en el timo, donde los timocitos lo expresan por primera vez y tienen que diferenciarse hacia el linaje CD4 o CD8. Los dos reguladores maestros o principales a nivel transcripcional para dicha modulación son THPOK (T-Helper-Inducing POZ/Krueppel-Like Factor, C-Krox), que coordina el desarrollo del linaje CD4 y RUNX3 (Runt Related Transcription Factor 3) que induce el linaje CD8. Aunque aún es un campo de activa investigación se cree que la duración de la señalización por TCR es una de los determinantes importantes en la expresión de CD8, puesto que contactos de larga duración entre TCR-pMHC inducen la expresión de THPOK y en consecuencia el re-direccionamiento de una células hacia linfocito CD4⁺ Th¹⁸. Las citocinas juegan de la misma manera un papel de peso. IL-7 (y en general citocinas de la familia del receptor de cadena común γ) promueve la expresión de RUNX3 y en consecuencia el compromiso del linaje CD8 en el timo⁵³. Tanto RUNX3 como THPOK son indispensables para que los timocitos “decidan” con qué linaje comprometerse ya que su ausencia se asocia con deficiencias en cualquiera de las subpoblaciones⁴². RUNX3 se activa por defecto y es reclutado a E8I en timocitos que están siendo seleccionados positivamente, mientras que suficiente expresión de THPOK no ocurre hasta más tarde en timocitos seleccionados por MHC de clase II. Aunque en ausencia de RUNX3 parece que la mayoría de los linfocitos se redirigen hacia el linaje CD4, THPOK es necesario en condiciones normales de desarrollo pues actúa como un represor del programa transcripcional de células CD8 y permite que el programa de diferenciación hacia linfocitos cooperadores se establezca^{18,42}. Incluso en la periferia, cuando ya las células T se han comprometido a un linaje u otro, la expresión forzada de THPOK en linfocitos CD8 induce la disminución de la expresión de CD8 y promueve la transcripción de genes relacionados con a células CD4 cooperadoras¹⁶⁸.

Además de los anteriores, se requieren factores extra para que los timocitos se diferencien hacia uno de los dos tipos celulares. TCF-1 (T-Cell-Specific Transcription Factor 1, codificado por *Tcf7*) y LEF-1 (Lymphoid Enhancer Binding Factor 1, codificado por *Lef1*) son dos TF con actividad HDAC que cooperan río arriba de los reguladores transcripcionales maestros para asegurar el compromiso hacia CD4 o CD8^{169,170}. Asimismo, MARZ participa en sinergia con RUNX3 en células CD8 para mantener la expresión de THPOK silente^{165,171}. Sin embargo, MARZ juega un papel dual ya que también es capaz de posicionarse sobre varios de los potenciadores de *Cd8* y suprimir su expresión, particularmente en timocitos DN^{160,165}.

En el caso de CD8, junto a RUNX3, RUNX1 y CBF (Core-binding factor)- β son necesarios para la diferenciación hacia CD8. Complejos formados por estos tres elementos se unen a THPOK y suprimen su expresión¹⁶⁰ y paralelamente se unen a E8I, E8II y E8V e inician la transcripción de *Cd8*. Otros factores que modulan los niveles de *Cd8* son SATB1, que se une a E8II y es necesario durante la activación de timocitos para la re-expresión de CD8 en respuesta a IL-7¹⁷², y BCL11B, un factor de transcripción pleiotrópico activo en varios estadios de la ontogenia de células T y que reprime la expresión de THPOK y RUNX3 (ratones deficientes de *Bcl11b* muestran un incremento de ambos en timocitos DP)¹⁶⁰. De forma opuesta, AIOLOS e IKAROS, dos TF de la familia de IKAROS, potencian la expresión de CD8 $\alpha\beta$ ¹⁶⁰.

La regulación periférica de la transcripción de CD8 ha sido estudiada con menor detalle. Al igual que en timocitos DP, complejos RUNX se unen a E8I, E8II y E8V en linfocitos T activados y suscitan la expresión de CD8, un proceso que depende de HDACs y CBF β /RUNX3^{159,160}. Inesperadamente, RUNX3 es prescindible para el mantenimiento de CD8 en linfocitos CD8⁺ vírgenes, sugiriendo que los niveles de CD8 requieren regulación mayoritariamente durante la activación de células T. De la misma forma, la acetil transferasa

KAT6A y E8I son cruciales en el mantenimiento de CD8 tras la activación del TCR y la formación de memoria, como muestra un reciente estudio en el que células T efectoras reducen la expresión de CD8 en ausencia de ambos a pesar de montar una respuesta inmunitaria secundaria normal^{161,162}. Adicionalmente, BCL11B controla directamente la transcripción de CD8 mediante la asociación a E8I y E8V, asegurando la expresión de CD8 durante la activación de células T tanto *in vitro* como *in vivo*¹⁷³. En general, aunque de forma más acusada en ciertas condiciones, existe una tendencia hacia la represión de CD8 tras la activación del TCR¹⁵⁴. A ello puede que asista parcialmente CREM (del inglés “cAMP Responsive Element Modulator”), un TF que contribuye a las alteraciones epigenéticas descritas en el síndrome autoinmune lupus eritematoso sistémico (LES). Al estimular células T CD8⁺ de pacientes con LES o ratones con un fenotipo “lúpico”, CREM se expresa e induce la metilación de ADN del locus de *Cd8*, contribuyendo a un silenciamiento del mismo^{174,175}.

CÉLULAS T CD4⁻CD8⁻ DOBLE NEGATIVAS: UNA SUBPOBLACION MENOR DE LINFOCITOS T

Los linfocitos T que carecen de CD8 y CD4, y por ello llamados células T CD8⁻CD4⁻ doble negativas (DN) representan una pequeña proporción del grueso de células T. El nombre “linfocito T DN” sin ninguna anotación extra, engloba varios subtipos de células. Sin embargo, nosotros utilizaremos aquí dicho término para referirnos a aquellos linfocitos T carentes de CD4 y CD8 que no están incluidos en otras clases de linfocitos T mencionados a continuación (Figura 3). Análogos fenotípicos de células T DN (es decir, linfocitos T que no expresan CD8 ni CD4) pueden observarse en poblaciones de células T mejor caracterizadas como es el caso de MAITs, iNKTs y células TCR- $\gamma\delta^{+}$. LA mayoría de estos linfocitos pueden actualmente ser identificados por la expresión de TCRs únicos mediante tinción de estas células con

anticuerpos y MHC-polimerizados acoplados a fluoróforos: Tetrámeros de MR1, de CD1 y anticuerpos contra el TCR- $\gamma\delta$, respectivamente. Igualmente, ciertas moléculas, tal como CD56, NK1.1, IL-18R α y CD161 se encuentran expresadas casi exclusivamente en estos subtipos y en consecuencia pueden servir como una manera de distinguirlas fenotípicamente de otras poblaciones de linfocitos. Si bien estas clases de células T pueden clasificarse en base a su expresión de CD8 y CD4, como ocurre para células T convencionales, una fracción significativa de ellas carecen, como ya se mencionó, de ambos co-receptores. Sin embargo, la expresión de co-receptores no está relacionada con la ontogenia o función de estos linfocitos, cada uno de ellos con una biología característica^{48,52,176}.

Aunque MAITs, iNKTs y linfocitos T $\gamma\delta$ son subtipos minoritarios en comparación a los linfocitos T $\alpha\beta$ CD4⁺ y CD8⁺ convencionales, estas células son importantes en respuestas inmunitarias contra infecciones y tumores^{39,177,178}.

Las células MAIT se expanden en infecciones respiratorias¹⁷⁹ y las células NKT son críticas en el control de ciertas infecciones víricas, bacterianas y parasitarias^{180–182}. Los linfocitos NKT son también esenciales en coordinar la respuesta inmune a tumores y la eliminación de los mismos^{183,184}. Las células T $\gamma\delta$, por el contrario, no solo tienen un papel protector sino también patológico en algunas condiciones. Si bien son prescindibles en la respuesta a ciertas infecciones como la infección por LCMV (virus de la coriomeningitis linfocítica), son necesarias para el desarrollo de respuestas primaria y secundaria completas contra otros microorganismos como el virus del Nilo Occidental o cepas de *Nocardia*. Además, son promueven la patología autoinmune en enfermedades como la psoriasis y la esclerosis múltiple³⁹.

Aun así, a pesar de todos los avances recientes en el entendimiento de la complejidad de los subtipos de linfocitos T y sus funciones, un papel definido para las células T DN distintas de las incluidas en estas tres categorías se desconoce. ¿Son células efectoras pro-inflamatorias o por el contrario linfocitos reguladores? ¿Modulan/promueven la respuesta

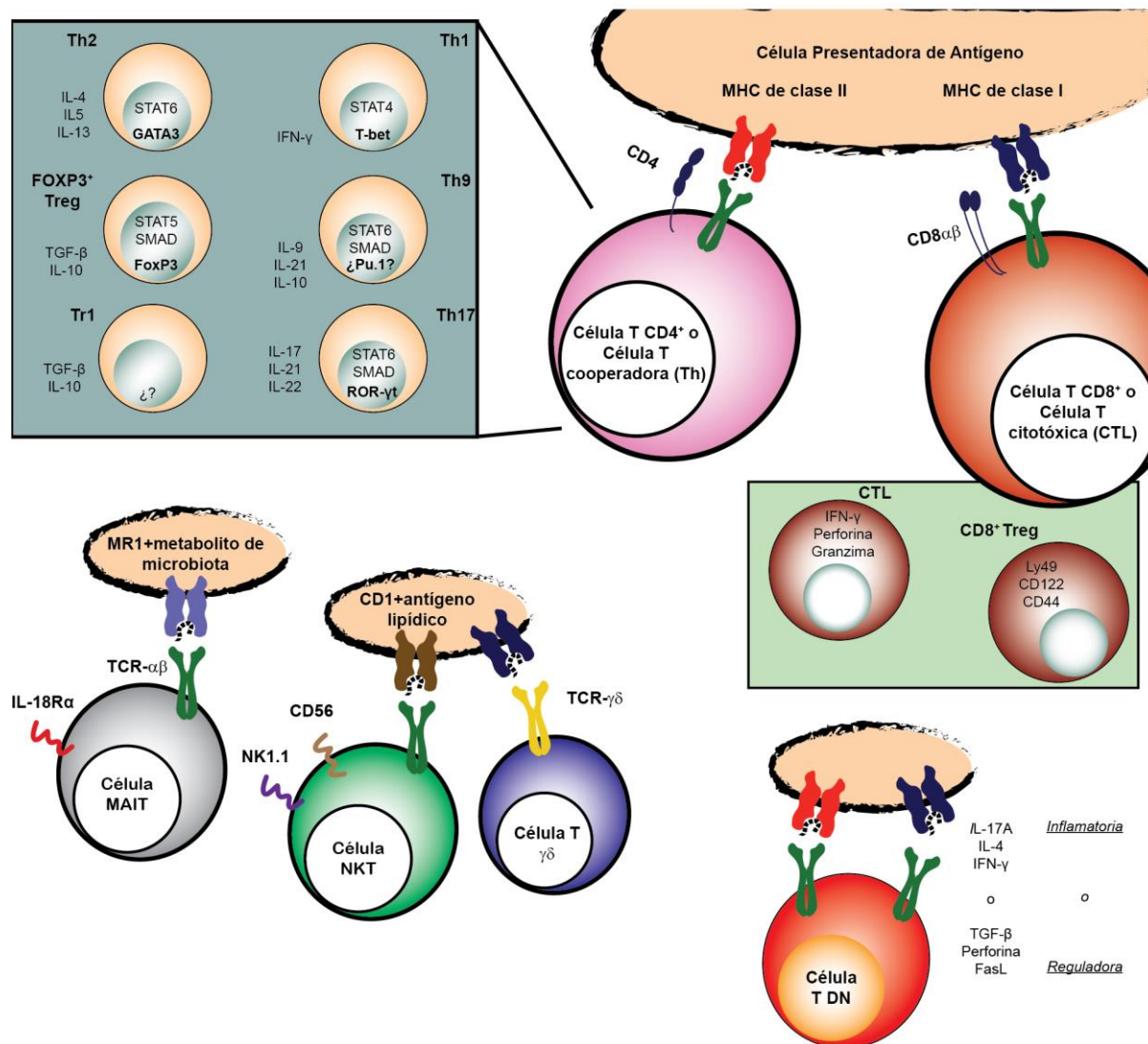


Figura 3. Tipos de linfocitos T. La población de linfocitos T se compone de varias subpoblaciones con distintos rasgos. Las dos poblaciones mayoritarias, células CD4⁺ y CD8⁺, se componen de linfocitos T reguladores y de células efectoras de naturaleza citotóxica o cooperadora. Además, poblaciones minoritarias de linfocitos, caracterizados por reconocer diferentes moléculas de MHC clase I, están presentes en la periferia, especialmente en el tejidos de tipo mucosa, y participan en procesos de autoinmunidad, defensa contra infecciones y rechazo de tumores (células T $\gamma\delta$, MAIT y NKT). Otra subclase son las células T carentes de CD8 y CD4 (DN), cuya naturaleza no ha sido precisamente definida, y las cuales parecen participar en respuestas inflamatorias pero también mediar procesos regulatorios en ciertas condiciones.

inmunitaria a patógenos o contribuyen a la autoinmunidad? Dentro de la mayoría de las poblaciones de células T descritas hasta ahora (CD8, CD4, NKT, etc.) uno puede encontrar subcategorías de linfocitos pro-inflamatorios y reguladores, situación que probablemente sea también cierta para las células T DN.

ONTOGENIA DE LAS CÉLULAS T DN

El origen de las células T DN que se encuentran en sangre y tejidos periféricos es bastante controvertido, lo cual puede nuevamente reflejar la existencia de múltiples subgrupos de linfocitos DN (Figura 4). Aunque lo más probable es que derivan de precursores linfoides situados en la medula ósea y que posteriormente migran al timo y se diferencian en células T vírgenes maduras, varias observaciones sugieren vías de ontogenia alternativas. El hecho de que carezcan de ambos co-receptores CD8 y CD4 podría indicar que en ningún momento de su desarrollo han adquirido los mismos y no siguen la vía de desarrollo canónica de los linfocitos T en el timo (esto es, timocito DN → timocito DP → timocito SP → RTE → célula T virgen madura)¹⁸⁵. No obstante, esta idea no se ajusta al hecho de que el locus de *Cd8* está parcialmente desmetilado en células T DN periféricas y cuyo patrón de metilación sugiere que derivan de timocitos DP^{174,175,186}.

Experimentos de timectomía o con ratones atímicos han mostrado que tras eliminar el timo, células T DN pueden aun detectarse en órganos periféricos, indicando una ruta extratímica de desarrollo para los linfocitos DN^{187–189}. Ford y colaboradores también usaron en su trabajo ratones CD8^{-/-} (CD8KO) y observaron que los números de DN no cambiaron entre ratones silvestres (con el gen *Cd8* intacto) y ratones KO. Sin embargo, en todos estos casos, los linfocitos DN podrían proceder de células T DN remanentes o de un

desarrollo anormal causado por la ausencia de timo o co-receptores¹⁹⁰. De hecho, la ausencia genética de ambos co-receptores fuerza la aparición aberrante de células T DN portando TCR que reconocen ligandos distintos a pMHC¹²². De cualquier manera, el origen extratímico o un desarrollo no canónico dependiente del timo en los linfocitos DN podría no ser la única vía de desarrollo a partir de la que se generan células T DN, o podría representar una ruta alternativa minoritaria como ocurre con CD8, CD4 o células NKT, de forma particular en individuos de avanzada edad o con deficiencias en el desarrollo tímico^{176,191–193}. Apoyando la necesidad del timo para su ontogenia, ratones timectomizados presentaron un defecto acusado en la proporción de células T DN que respondían a influenza¹⁹⁴.

Varios grupos han reportado que las células T CD8 $\alpha\alpha$ y DN asociadas a la mucosa intestinal derivan de timocitos DP con TCR autorreactivos. En esta situación, algunos timocitos DP reactivos para antígenos propios que están programados para entrar en apoptosis adquieren un fenotipo con expresión reducida de ambos co-receptores (CD8^{low}CD4^{low}) y sobreviven la selección negativa tras lo cual migran hacia la mucosa intestinal^{50,51,127,195}. Si bien estos experimentos demostrarían el origen de los linfocitos T DN asociados a la lámina propia intestinal, las placas de Peyer y el epitelio intestinal, estas células no se encuentran en el bazo y otros órganos linfoides secundarios por lo que no explicarían la ontogenia de todas las células T DN. Fenotípicamente estos linfocitos T DN autorreactivos expresan moléculas clásicamente asociadas a linfocitos de tipo innato y expresan CD8 $\alpha\alpha$ en casi su cien por cien por lo que no son células T DN en sentido estricto. Además, los linfocitos CD8 $\alpha\alpha$ DN autorreactivos poseen un repertorio oligoclonal de cadenas $\alpha\beta$ del TCR^{50,51}.

Independientemente de un desarrollo directo desde el timo o fuentes extratímicas, un gran cuerpo de evidencia apunta a que las células T DN pueden diferenciarse de células T

CD8⁺ y CD4⁺ maduras^{196–199}. Como ya se mencionó los niveles de CD8 y CD4 pueden modularse en respuesta a la activación vía TCR, lo cual es de gran importancia en células CD8 donde la ausencia de CD8 disminuye significativamente la afección del TCR/CD8 por pMHC^{132,200}. Linfocitos con un fenotipo DN pueden detectarse en pacientes con virus de la inmunodeficiencia humana (VIH). Se cree que la infección por VIH de células CD4 causa la regulación a la baja del co-receptor^{199,201–203}. Alternativamente, la estimulación crónica de los linfocitos consecuencia de la infección, haría que estos pierdan CD4. Esta idea está apoyada por un estudio reciente que muestra que tras tres semanas de varias rondas de activación a través del TCR, las células T CD4 pierden la expresión del co-receptor tornándose DN^{204,205}. En ratones, linfocitos DN restringidos por MHC de clase II controlan la infección por *Leishmania major*²⁰⁶. Se ha visto además que las células T CD4 se convierten en células DN cuando se estimulan con DC alogénicas o con el mitógeno concanavalina A (ConA)^{198,207}. Las células DN así generadas tienen ciertas capacidades reguladoras capaces de suprimir respuestas inmunes alogénicas.

En consonancia con una altamente modulable expresión de CD8 como mecanismo para regular el reconocimiento antigénico por el TCR, cuantiosos estudios han observado que las células T regulan a la baja CD8 y pueden incluso detener la síntesis de mRNA de *Cd8*, abriendo la posibilidad de que las células T DN deriven de linfocitos CD8⁺. Como se comentó anteriormente, las células CD8 disminuyen los niveles de CD8 cuando responden a antígeno específico durante una infección o en respuesta a otros factores ambientales como el IFN de tipo I o la ausencia de IL-7/IL15^{147,156}. Del mismo modo, la activación óptima y polarizante de linfocitos CD8 (p. ej. cuando se activan por DCs) ocasiona la división asimétrica de la célula madre, de forma que la célula hija distal a la sinapsis inmune (IS) recibe menor concentración de CD8, posibilitando que quizá, tras varias rondas de división, exista una población de células

con heterogénea expresión de CD8 y entre ellas, linfocitos DN²⁰⁸. No obstante, parece que CD8 no es perdido únicamente durante el encuentro con antígeno específico, sino que su expresión también se silencia al perder las señales tónicas que el TCR recibe constantemente de complejos MHC/antígenos propios no específicos^{149,209}, haciendo posible que los linfocitos DN puedan generarse tanto de células CD8⁺ activadas, como de contrapartes que por alguna razón no continúan recibiendo señales homeostáticas de forma óptima. Sin embargo, de nuevo apoyando su ontogenia a partir de células CD8 activadas, es posible que tanto la expresión del TCR como de CD8 se regulen como mecanismo para mantener tolerancia hacia antígenos propios^{210,211} y que las células DN se diferencien de linfocitos T autorreactivos. De conformidad con esto, subpoblaciones de células T CD4⁻CD8^{low} han sido descritas en ratones transgénicos para la cadena del TCR Vβ5 que encuentran un “tolerogenizante” (“tolerant”) desconocido^{212,213} y ratones con el TCR transgénico HY-TCR que reconoce un antígeno menor de histocompatibilidad presente solo en ratones macho (H-2D^b-Smcy)^{97,214–216}.

La IL-4 puede inducir la pérdida de CD8 en células activadas, un proceso que es reversible pero que además de silenciar *Cd8*, confiere a estos leucocitos un fenotipo de tipo Th2^{153–155}. Nuestro grupo ha observado que una fracción de células CD8 humanas activadas a través del TCR con inmunoglobulinas anti-CD3/anti-CD28 *in vitro* regulan a la baja CD8, de forma más acusada en muestras de pacientes con LES¹⁹⁷. *In vivo*, las células T DN se acumulan tras la activación por TCR de linfocitos CD8⁺ con TCR transgénico que no pueden entrar en apoptosis por la vía del receptor de muerte Fas/CD95, ya que son deficientes en la expresión del mismo (por una mutación llamada *lpr*, ratones Fas^{lpr})²¹⁷. Los ratones de la cepa B6 (C57BL/6) con la mutación *lpr*, que se caracterizan por una acumulación masiva de células T DN, supuestamente debido a los defectos en apoptosis que conlleva la mutación *lpr*. Interesantemente, las células T DN no se acumulan o emergen en ratones que carecen

simultáneamente de CD8 o MHC de clase I (ratones CD8KO o $\beta 2m$ KO, respectivamente) o que han sido tratados con anticuerpos anti-CD8 citotóxicos, y que en consecuencia no tienen linfocitos T CD8 convencionales^{218,219}. Resulta intrigante que las linfocitos T DN se acumulen de dos a cincuenta veces en modelos murinos o enfermedades humanas (síndrome linfoproliferativo autoinmune, SLPA, o ALPS, de sus siglas en inglés) donde existe un defecto en la vía extrínseca de la apoptosis iniciada por la interacción de Fas con su ligando FasL (en el caso de los modelos murinos, ratones Fas^{lpr} o *gld*, con defectos en FasL; FasL^{gld}), interacción importante en la eliminación de linfocitos autorreactivos⁷⁶. En pacientes con SLPA, donde las células T DN adquieren la expresión de CD45R/B220, una isoforma de CD45 cuyo análogo murino se expresa en linfocitos B²²⁰, también se pueden encontrar poblaciones de células T CD4⁺ y CD8⁺ con un fenotipo similar al de estas leucocitos T DN, lo cual podría indicar que estas células son precursores de DN²²¹. De forma similar, en el equivalente murino de SLPA (mutaciones *lpr* y *gld*), las células T DN expresan B220²²². Curiosamente, en estudios como los mencionados anteriormente, en los que se elimina CD8 o falta la expresión de MHC de clase I^{223–225} la falta de acumulación de linfocitos DN se ve reemplazada por una población de linfocitos CD4⁺B220⁺, nuevamente apoyando el origen preferencial de las DN a partir de células CD8⁺. Un par de estudios apoyan la idea de que las células T DN se acumulan normal e independientemente de linfocitos T CD8⁺ y CD4⁺ en individuos sanos tras activarse, quizá como un estado de diferenciación terminal previo a la muerte celular^{196,226}. Mohamood y colegas mostraron que además de B220, otro marcador, sindecan-1, expresado preferencialmente en linfocitos T DN en B6.FasL^{gld} (el punto indicando cruza entre las dos cepas de ratones), puede también detectarse en células T DN presentes en el intestino en ratones normales a medida que envejecen. En este caso, aunque los autores argumentan que esta observación sugiere que las células DN no derivan de linfocitos T CD4⁺ o CD8⁺,

ciertamente tampoco lo excluye. Interesantemente, González-Quintial y colaboradores han observado que en ratones Fas^{lpr}, en condiciones de proliferación inducida por linfopenia, la cual es mediada por la señalización de IL-7/IL-15 y la potenciada interacción tónica del TCR con MHC y antígenos endógenos, tanto linfocitos CD4⁺ como CD8⁺ se diferenciaban hacia células T DN, si bien esto ocurría preferencialmente en linfocitos CD8⁺^{227–229}. La generación de DN derivadas de células CD8⁺ también se ve apoyada por el hecho de que tanto linfocitos T CD8⁺ como DN en pacientes con SLPA muestran un repertorio de cadenas Vβ del TCR similar y distinto del observado en células CD4⁺²³⁰. Así pues, todos estos descubrimientos sugieren que una considerable proporción de linfocitos T DN, si no todos, pueden derivar de células T CD8 en ciertas condiciones. El escenario más probable, sin embargo, es que las células T DN, dependiendo de su naturaleza, se originen a través de distintas vías: directamente desde el timo o a partir de células T CD4⁺ y CD8⁺ activadas en la periferia.

Tradicionalmente la formación y acumulación de linfocitos T DN se ha relacionado por todo lo anterior con defectos en apoptosis, pues se acumulan en ratones Fas^{lpr} y FasL^{gld}, así como en otros modelos murinos deficientes en apoptosis desarrollados más recientemente^{196,209,231}. Esta idea se ve sustentada por algunos trabajos que han señalado a B220 como un marcador que es regulado al alta en células T y timocitos destinados morir por apoptosis^{232–234}. Sin embargo, varias evidencias indican lo contrario. Otras cepas de ratones deficientes en la inducción de apoptosis de células T como los ratones deficientes en BIM o con expresión transgénica de BCL2^{111,235} carecen de acumulación de linfocitos T DN. Asimismo, Hao y otros investigadores demostraron que la delección de Fas específica para

células T (ratones *Cd4-Cre.Fas^{flox/flox}*) no se tradujo en la acumulación de linfocitos T DN, a menos que FasL fuese bloqueado simultáneamente²³⁶. De forma interesante, cuando en lugar de eliminar Fas con *Cd4-Cre*, se empleó la expresión de la recombinasa Cre a partir del promotor proximal de *p56^{Lck}* (*Lck-Cre*), se reprodujo la acumulación de células T DN observadas en ratones con delección global de Fas²³⁷. No obstante, se ha mostrado como ratones *Lck-Cre* tienen defectos intrínsecos en el desarrollo de células T con cierta

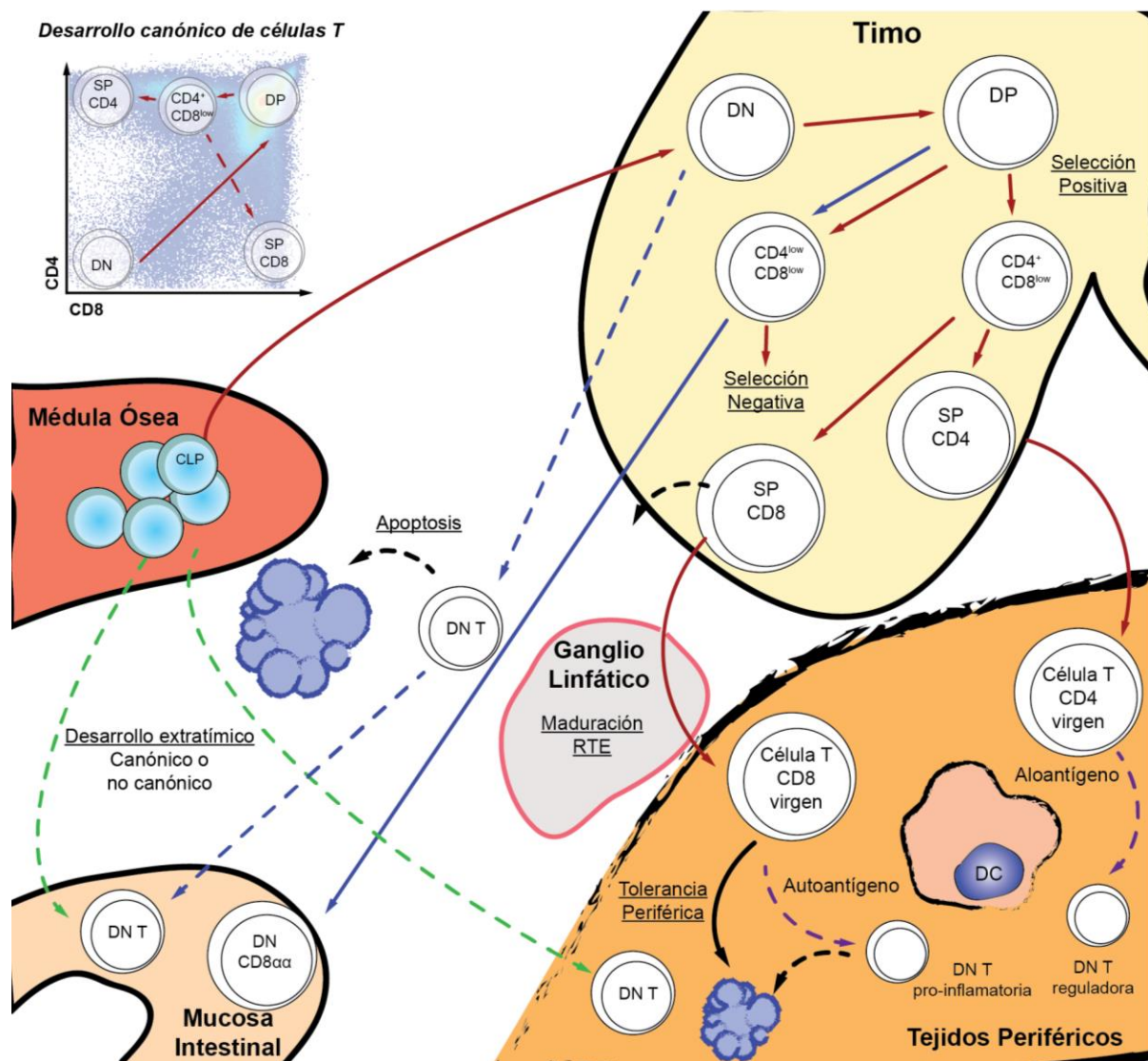


Figura 4. Desarrollo de células T doble negativas. Múltiples evidencias apuntan a que pueden existir distintas vías de desarrollo para la generación de las células T DN. De este modo, podría existir una vía de diferenciación independiente del timo. Las otras posibles rutas de ontogenia son timocitos seleccionados negativamente que escapan a la apoptosis, y la maduración a partir de células T CD4⁺ o CD8⁺ activadas

acumulación de linfocitos T DN²³⁸, explicando quizá el porqué de esta discrepancia. Por último, un trabajo reciente capaz de diseñar una cepa de ratón en la que la expresión de Fas es normal pero su función como inductor de la apoptosis está dañada, demostró como las células T DN solo se acumulan en ausencia completa de Fas y no cuando falla únicamente su función pro-apoptótica^{239,240}. Ello indicando que probablemente otras funciones de Fas/FasL distintas de la apoptótica puedan contribuir a la acumulación de linfocitos T DN en ratones Fas^{lpr}, FasL^{gld} y pacientes con SLPA^{241–243}. Nuevamente, toda esta evidencia en cierta medida discrepante aunque no excluyente, está indicando que probablemente las células T DN no representen un tipo único y homogéneo de linfocitos y su ontogenia varíe con cada subpoblación que incluya.

LINFOCITOS T DN COMO CÉLULAS SUPRESORAS

La observación de que las células T DN (células CD3⁺CD4⁺CD8⁻) podrían ser linfocitos con función reguladora del sistema inmune y mostrar capacidad supresora comenzó hacia finales de la década de los años ochenta en modelos de enfermedad de injerto contra huésped (GVHD) cuando los linfocitos T estaban aún siendo caracterizados^{244–247}. En repertorios policlonales y modelos transgénicos de TCR, la observación general fue que cuando había células T DN presentes entre las células del donador, los injertos eran tolerados y los ratones no desarrollaban signos de autoinmunidad. Desde entonces, varios grupos han reportado propiedades reguladoras en linfocitos T DN. Zhang y coinvestigadores^{248,249} han definido las células T DN reguladoras en cepas de ratones con MHC parcialmente disparejo (B6xdm2)_{F1}. Las células T DN fueron capaces de prolongar la supervivencia de trasplantes de piel de dos a cuatro veces más que en ratones que no recibieron células T DN, e inhibieron la

proliferación de y asesinaron células T CD8 efectoras diana que compartían el mismo TCR. Resultados similares se obtuvieron por un laboratorio independiente utilizando el TCR transgénico OT-I, que reconoce H-2k^b-SIINFEKL (un péptido contenido en la ovoalbúmina de huevo de gallina , OVA) en ratones expresando OVA como antígeno propio en la membrana de queratinocitos y simultáneamente OT-I¹⁰⁴. Como se mencionó previamente, aunque la mayoría de los modelos para estudiar DN reguladoras están basados en TCR transgénicos restringidos por MHC de clase I (TCRs 2C, HY y OT-I), estas células parecen derivar de linfocitos T CD4⁺ que han visto pMHC de clase II endógeno o alogénico^{198,207,250,251}, e incluso de linfocitos no restringidos por MHC^{187,252}.

Observaciones similares se han realizado en otros modelos. Linfocitos T DN transferidos de ratas donantes fueron capaces de mejorar la sobrevida de xenotrasplantes cardiacos en ratones B6²⁵³. En un modelo de alergia, las células T DN parece que tienen un papel inmunomodulador siendo capaces de reducir la producción de IgE²⁵⁴. Linfocitos T DN reguladores han sido descritos en tejido linfoide nasal (NALT). Interesantemente, estas células DN asociadas a NALT expresaban B220, el antígeno de células B hallado en células DN en ratones Fas^{lpr}²⁵⁵. Además de en relación a tolerancia de trasplante, las células T DN reguladoras parecen reducir o retardar el comienzo de la diabetes en ratones diabético no obesos (NOD)^{250,256–258}, y estar presentes en riñones con daño por isquemia-reperfusión²⁵⁹. En humanos hay poca evidencia apoyando el papel supresor de las linfocitos T DN y se basa mayoritariamente en correlaciones²⁶⁰. No obstante, Voekl y colegas caracterizaron células T DN con *in vitro* capacidad supresora²⁶¹.

El fenotipo y caracterización de estas células reguladoras DN es bastante único ya que expresan TLR4, FcεRI, FcRγ, SCA-1/Ly-6A y sindecan-1^{226,262–264} moléculas asociadas a células

de otros linajes distintos del de linfocitos T. Algunos estudios indican que estas células tienen un fenotipo activado²⁵¹ mientras otros describen que tienen bajos niveles de marcadores de activación²⁴⁸.

Ejercen su función reguladora a través de múltiples mecanismos. Requieren IFN- γ y FcR γ ^{263,265} y su capacidad supresora es potenciada por IL-2²⁶⁶ a la par que inhibida por IL-7 e IL-10^{250,267}. Aunque no se les ha adscrito un papel como T_{FH} o células T foliculares reguladoras (T_{FR}), las células T reguladoras DN expresan CXCR5, receptor de quimiocinas necesario para que medien su efecto en injertos cardiacos alogénicos^{262,268}. Son capaces de sintetizar granzimas y perforinas^{198,262,269,270}, e inducir la apoptosis en células blanco mediante la vía de Fas/FasL²⁷¹. Asimismo, parecen modular la actividad de las DC e incluso adquirir complejos pMHC de éstas mediante trogocitosis^{272,273}. Promueven el desarrollo de linfocitos Treg CD4⁺FOXP3⁺²⁷⁴, aunque paradójicamente reducen la concentración de IL-2. Asimismo, secretan las citocinas anti-inflamatorias IL-10 e IL-27²⁵⁹, y son capaces de matar células T, B y DC, lo que se propone como otra forma de modular a la baja la respuesta inmune^{248,250,269,275,276}.

Sin embargo, una debilidad de la mayoría de los estudios mencionados aquí que reportan propiedades reguladoras en células T DN, exceptuando aquellos llevados a cabo en ratones NOD^{250,277}, es que para observar el efecto supresor ya sea *in vitro* ya sea *in vivo*, se requiere un vasto número de linfocitos T DN. En términos generales, células Treg CD4⁺ convencionales (FOXP3⁺ y Tr1) pueden ejercer su función supresora en presencia de una proporción elevada de células efectoras -1:4 o 1:8 relación de Treg:Teff *in vitro* o con la transferencia de un número relativamente bajo de Treg en ratones que desarrollaran autoinmunidad en ausencia de Tregs²⁷⁸. Por el contrario, la actividad supresora de las células

T DN solamente puede detectarse cuando la proporción de linfocitos T DN respecto a efectores CD8 es de 4 a 1 o cuando elevadas cantidades ($1-2 \times 10^7$) de células DN son transferidas a ratones para controlar la respuesta inmunitaria^{104,198,248,251}. Esto argumenta en contra de la naturaleza reguladora de las células T DN, lo cual también hace el hecho de que pueden producir citocinas pro-inflamatorias y están incrementadas en enfermedades autoinmunes, contrariamente a lo que ocurre con células Treg, cuya actividad y números están reducidos en estas enfermedades²⁷⁹. Esto podría interpretarse como que los linfocitos DN no son en realidad células reguladoras. No obstante, en vista de la evidencia, probablemente un porcentaje de células T DN, aún por definir con precisión, muestre cierto potencial inmunomodulador pero para poder apreciarlo es necesario que se expandan (p. ej. mediante activación al reconocer MHC alógenos) o sean transferidas en números suficientes de forma que hay suficientes linfocitos T DN reguladores junto a los demás subtipos efectores para que ejerzan su función supresora (p. ej. 1 en $8-32$ células T DN quizá tengan capacidad reguladora).

LINFOCITOS T DN COMO CÉLULAS PRO-INFLAMATORIAS Y AUTORREACTIVAS

A las células T DN se les ha otorgado un papel pro-inflamatorio en respuestas a infecciones y en particular en condiciones autoinmunes. Una fracción significativa de linfocitos T DN en humanos y ratones son capaces de producir citocinas pro-inflamatorias tras estimularlas *ex vivo*^{280,281}. El conjunto de moléculas pro-inflamatorias que pueden secretar difiere dependiendo del tipo de respuesta inmunitaria investigados, pero en general pueden producir una cantidad significativa de IL-17A e IFN- γ . En LES éstas pueden además producir IL-1, factor de necrosis tumoral (TNF) e IL-4^{197,282,283}. Sorprendentemente, en LES también son

capaces de sintetizar IL-10, una citocina considerada reguladora²⁸⁴. En individuos sanos, las células T DN muestran una arquitectura epigenética sesgada fuertemente hacia una firma pro-inflamatoria, con una conformación de la cromatina permisiva en loci de varias citocinas (p. ej. IL-17, IL-18 y factor de activación de células B, BAFF)²⁸⁵. Particularmente en SLPA y LES muestran un fenotipo activado característico de células T efectoras terminalmente diferenciadas^{221,286}. En ratones Fas^{lpr} también expresan elevados niveles de perforina y granzimas que sugieren capacidad citotóxica²⁸⁷. Asimismo, algunos resultados sugieren que pueden proporcionar ayuda a los linfocitos B para producir autoanticuerpos^{288,289}.

A pesar de la falta de co-receptor, las células T DN parecen ser capaces de participar en respuestas inmunitarias contra patógenos. Proliferan y se activan en infección por *L. major* y contribuyen a la respuesta primaria y secundaria a través de la producción de cantidades importantes de TNF e IFN- γ , y muy probablemente matando a células infectadas vía granzima B²⁰⁶. En pacientes con enfermedad de Chagas, las células T DN, al igual que los linfocitos T $\gamma\delta$, responden *in vitro* a antígenos derivados de *Trypanosoma cruzi* produciendo IL-17, TNF, IFN- γ ²⁹⁰. Linfocitos T DN IL-23R⁺ productores de IL-17 se expanden en respuesta a infecciones con *Listeria monocytogenes* y *Francisella tularensis*^{281,290,291}, donde también son capaces de producir IFN- γ , TNF y GM-CSF^{188,292}. Hay que notar que aunque las células T DN IL-23R⁺ no contienen linfocitos NKT o MAIT, un estudio posterior determinó que en el caso de la infección pulmonar por *F. tularensis*, la mayoría de las células T DN eran realmente células MAIT¹⁷⁹. No obstante, Neyt y colaboradores¹⁹⁴ mostraron recientemente que linfocitos T DN con un fenotipo distinto al de células NKT, MAIT o TCR- $\gamma\delta$ ⁺, responden a infección pulmonar por influenza, apoyando la tesis de que las células T DN representan una subpoblación celular precisa capaz de responder a patógenos.

Aunque el posible rol de los linfocitos T DN en respuestas antitumorales no ha sido explorado en profundidad, estas células han sido observadas asociadas a tumores. Voelkl *et al.* aislaron un clon de linfocito T DN reactivo contra gp100 a partir de un paciente con melanoma y observaron que dicho clon tenía la capacidad de producir IFN- γ , TNF y granzima B al estimularlo con el antígeno específico²⁶¹. Asimismo, células T con un fenotipo DN han sido descritas como parte de los linfocitos T que infiltran tumores (TIL). En este caso estos TILs DN poseían un fenotipo de activación subóptimo, estaban sensibilizadas a entrar en apoptosis durante reactivación y no parecían depender de MHC de clase I²⁹³.

En general, la proporción y números de las células T DN están aumentados en varias enfermedades autoinmunes^{221,280,294–298}. En el caso de autoinmunidad pediátrica, enfermedad de Behçet y β -talasemia, la cuantificación de DN llevada a cabo no distinguía entre células TCR- $\gamma\delta^+$ o TCR- $\alpha\beta^+$, dejando únicamente al LES, a la esclerosis sistémica, al SLPA y al síndrome de Sjögren (SS) como enfermedades autoinmunes confirmadas con elevación de células T DN (TCR- $\alpha\beta^+$). Con excepción de SLPA, donde los linfocitos T DN se acumulan principalmente en órganos linfoides secundarios produciendo esplenomegalia y adenomegalia, las células T DN se encuentran infiltrando los órganos blanco de la enfermedad y modelos murinos asociados^{280,296,299,300}. Pueden observarse en los infiltrados leucocitarios de riñones de pacientes con LES y ratones MRL/MPJ.Fas^{lpr} (MRL/lpr), un modelo murino para LES y SLPA. Igualmente ocurre en el síndrome de Sjögren para las glándulas salivales. En ambos casos, la fracción de linfocitos T DN está aumentada en la sangre periférica de estos pacientes. Asimismo, parece ser que están incrementadas en la sinovia de pacientes con artritis idiopática juvenil (JIA) (Dr. Abbe N. De Vallejo, comunicación oral, ICI2016)³⁰¹.

En varios modelos murinos de enfermedad autoinmune las células T DN producen activamente citocinas y se cree que son linfocitos autorreactivos y causantes de daño tisular.

En ratones con STAT3 constitutivamente activo, linfocitos T DN productores de IL-17 contribuyen a la inflamación y daño de la piel³⁰². En un modelo de hipersensibilidad de tipo retardado (DTH) usando carragenato λ en ratones TCR HY, donde las células T DN se acumulan en ratones macho debido probablemente a la presencia de autoantígeno, la inflamación causada por la inyección de carragenato λ fue más severa en ratones macho, lo cual se atribuyó a la presencia de DN³⁰³. Además, aunque los linfocitos T DN no se han asociado en humanos a espondilitis anquilosante u otras artropatías³⁰⁴, un modelo de inflamación de la entesis sugiere un papel crítico para células T DN IL-23R⁺ROR- γ t⁺ como mediadores de inflamación¹¹³. Ratones de distintos fondos genéticos pero conteniendo la mutación *lpr* son usados como modelos de SLPA y LES. En estos modelos, como ya se mencionó, las células T DN incrementan su número y tienen el potencial de producir citocinas pro-inflamatorias. En consenso con un rol patogénico o pro-inflamatorio de los linfocitos T DN, la proporción de estas células generalmente disminuye cuando los ratones son tratados con inhibidores y compuestos que mejoran la patología lúpica^{305–309}.

Otra evidencia que apoya que los linfocitos T DN son, o al menos contienen, bona fide células productoras de IL-17 es que expresan el regulador transcripcional maestro de las Th17, ROR (del inglés, “RAR-related orphan receptor”)- γ t y CCR6^{113,280,281,296,302}. Igualmente, presentan concentraciones elevadas de transcritos codificantes para IL-21 e IL-22 y requieren IL-23R para su expansión, lo cual las compara con células Th17 patogénicas¹¹². De hecho la señalización por IL-23 es crucial para que se acumulen las células T DN en modelos de ratón de lupus y para que se establezca la enfermedad en los mismos^{299,310}.

No obstante, no existe aún una prueba directa que demuestre que las células T DN son críticas para el comienzo o la progresión de enfermedades autoinmunes, o que juegan un papel importante durante el control de infecciones. La mayoría de la evidencia se basa en la

observación de que pueden producir citocinas pro-inflamatorias, presentan un fenotipo activado, se expanden durante respuestas inmunes (bien contra antígenos exógenos, bien como parte de la autoinmunidad) y que la inhibición de vías de señalización que contribuyen al desarrollo de autoinmunidad corrige la expansión anormal de linfocitos T DN.

El hecho de que las células T DN están asociadas con autoinmunidad y que están incrementadas en condiciones donde hay fallos en los mecanismos de tolerancia y hay un aumento de células autorreactivas plantea la posibilidad de que esta población linfocitaria incluya linfocitos reactivos contra antígenos propios. Las células T DN se acumulan en general en cepas de ratones con TCR transgénicos que expresan el antígeno específico como propio^{97,104,196,248,251,311}. Clones de células T DN autorreactivas se han aislado de ratones NZB/W_{F1} (siendo F1 la primera generación que resulta de cruzar las cepas “New Zealand Black”, NZB, y “New Zealand White”, NZW), otro modelo murino de LES³¹² y en 1993, Martínez y colaboradores³¹³, describieron que las células T DN presentan TCRs que hubiesen promovido la eliminación de células CD4⁺ y CD8⁺. Asimismo, aunque a diferencia de como ocurre en otras enfermedades como vitíligo o diabetes, en LES y modelos murinos asociados se desconocen los antígenos propios reconocidos por células T autorreactivas, si existe una reducción del repertorio policlonal de linfocitos T y una expansión de ciertos clones a medida que progresa la enfermedad, sugiriendo la expansión de células T autorreactivas^{36,314–316}. Sin embargo no existe evidencia directa que indique que los linfocitos T DN son células con especificidades por antígenos propios en individuos sanos o con enfermedad autoinmune.

SEÑALIZACIÓN EN CÉLULAS T DN

El comportamiento de las células T es controlado por el TCR en combinación con varios receptores co-estimuladores o inhibidores, así como por otras moléculas que censan citocinas y señales ambientales. En el caso que aquí nos ocupa, el de los linfocitos T DN, varias vías de señalización y moléculas han sido asociadas a su ontogenia y homeostasis.

Si bien ciertas células carentes de co-receptores pueden reconocer antígenos específicos (MAIT, NKT, células T $\gamma\delta$), en general CD4 y CD8 son necesarios para incrementar la avidéz del TCR por pMHC¹³², así como para aproximar p56^{Lck} y LAT a la sinapsis inmune^{137,138}. Se desconoce cómo las células T DN comienzan la señalización río abajo de la interacción pMHC-TCR, si es que si quiera la inician. Observaciones de que existe una porción de p56^{Lck} pre-activada³¹⁷, de que CTL carentes de co-receptores pueden activarse por antígenos virales y aloantígenos³¹⁸ y de que el TCR puede activar p56^{Lck} libre independientemente de CD8³¹⁹, hacen posible que las células T DN no requieran de co-receptor para iniciar la señalización mediante p56^{Lck} y fosforilar los ITAMs de CD3 ζ . Alternativamente FcR γ y SYK (del inglés “spleen tyrosin kinase”), necesarios para la función de las células T DN reguladoras²⁶³ y que quizá promuevan la hiperactividad del TCR en pacientes con LES³²⁰, podrían suplir por la falta de p56^{Lck} unida a co-receptores y promover la activación tras el reconocimiento de antígenos por parte de los linfocitos T DN. Esto se ve apoyado a la par por un estudio donde células T DN eran capaces de responder a infección por *L. monocytogenes* en ratones deficientes de p56^{Lck}¹⁸⁸. Otra proteína de la familia de las Src que parece importante en la activación de los linfocitos T DN en ratones Fas^{lpr} es p59^{fyn}. Aunque ésta no parece repercutir en células T CD4⁺ o CD8⁺, ratones B6.Fas^{lpr} deficientes de P59^{fyn} muestran una reducción en el porcentaje de linfocitos T DN y la proliferación de éstos

aparece disminuida³²¹. Indistintamente de quien comience los eventos iniciales de la señalización inducida por el TCR, en ratones MRL/MPJ.Fas^{lpr} se ha observado que las células T DN poseen una mayor permisividad para el influjo de calcio y en consecuencia una respuesta exacerbada al estimularlas con anticuerpos que entrecruzan el TCR³²², si bien se desconoce si este podría ser también el caso de linfocitos T DN en individuos sanos. Asimismo, las células T DN de pacientes con LES presentan hiperpolarización mitocondrial²⁸² y elevada producción de especies reactivas de oxígenos (ROS)^{323,324} lo que podría ocasionar que células que en condiciones normales no se activan por la ausencia de co-receptor, disminuyan el umbral de activación del TCR por la presencia de ROS y puedan señalizar³²⁵.

La señalización a través de NOTCH también parece importante en la acumulación y activación de células T DN en modelos murinos de SLPA³²⁶. Se observó que la aplicación de un inhibidor de la γ -secretasa, que evita el procesamiento de NOTCH de forma que no puede señalizar, reducía la linfoproliferación y que los linfocitos T DN eran más sensibles que células CD4⁺ y CD8⁺. Si bien se desconoce si la vía de NOTCH está hiperactiva en células T DN o si de ser así, cómo promueve la formación e incremento de las mismas, NOTCH es necesario para inducir la proliferación celular inducida por la activación del TCR en respuesta a antígeno específico³²⁷, lo cual sería necesario si las células T DN están reconociendo autoantígeno en SLPA. Asimismo, aunque nuevamente no se ha verificado directamente como se encuentra la ruta de señalización en células DN, en SLPA y LES o en sus modelos murinos, la actividad de la fosfatasa SHP2 se encuentra incrementada y en consecuencia, la actividad de ERK (“extracellular-signal regulated kinase”) se encuentra disminuida³⁰⁵. La corrección de esta actividad de fosfatasa mediante inhibidores disminuye la acumulación de DN, sugiriendo que quizá la actividad de ERK esté alterada en estas células.

Como ocurre con las células Th17³²⁸, la hiperactividad de mTOR (del inglés “mechanistic target of rapamycin”) ha sido descrita en linfocitos T DN de SLPA y LES^{221,282,329}, hecho que es ilustrado por la drástica reducción de células T DN en un modelo murino de SLPA tras la administración de rapamicina, un inhibidor de mTOR³³⁰. Junto al requerimiento de IL-23R para que se acumulen las células T DN en ratones Fas^{lpr}, y que en general producen IL-17^{281,310}, puede que los linfocitos T DN compartan rutas de señalización con células Th17. Es interesante sin embargo, que en el caso de las células T DN reguladoras, éstas tienen una baja actividad del eje AKT/mTOR, y que incrementar la misma mediante IL-7 abroga sus propiedades supresoras²⁶⁷

No existe un regulador transcripcional maestro para linfocitos T DN. Junto a ROR- γ t, la expresión de Eomesodermina (EOMES) parece estar incrementada en células T DN en ratones Fas^{lpr}. Tal es así que la eliminación selectiva de EOMES en células T revierte la acumulación de las células T DN y reduce los signos de autoinmunidad³³¹. p21 es un regulador del ciclo celular que inhibe la proliferación de células. Parece ser bastante importante en el control de células autorreactivas, ya que ratones Fas^{lpr} con sobre-expresión de p21 muestran una menor acumulación de linfocitos T DN y menor severidad de la enfermedad³³². Así pues, puede que en condiciones no autoinmunes, concentraciones normales de p21 inhiban la proliferación de células DN pero no así en modelos murinos de LES, donde estas células están activamente proliferando³²¹.

Aunque son refractarios a la estimulación por IL-2 y TCR *in vitro*, existe la posibilidad de que las células T DN requieran de IL-2 para expandirse, ya que ratones Fas^{lpr} deficientes de IL-2 no presentan un incremento en linfocitos T DN³³³. No obstante, contradiciendo lo anterior, un reporte reciente indica que la sobre-expresión de IL-2 en el mismo modelo

murino propicia la reducción de células T DN³⁰⁶. En este sentido, mientras que la IL-2 parece reducir la conversión, expansión o la viabilidad de las células T DN, se ha visto que la IL-17 puede tener un papel anti-apoptótico en linfocitos de pacientes con SLPA³³⁴.

Además de las rutas de señalización que se han mencionado, otras moléculas como SLAMF4³³⁵, CXCR5^{268,336} o CD44²⁸⁷ pueden tener importancia en la generación o función de las células T DN. Sin embargo, cómo contribuyen a ello exactamente se desconoce.

¿QUÉ ES LO QUE NOS FALTA POR CONSIDERAR?

La importancia de las células T DN dentro del sistema inmune ha sido desestimada en base a que varios estudios han reportado que son células que mayoritariamente no responden a desafío antigénico^{197,337}, que son una subpoblación minoritaria de linfocitos T y que no existen marcadores únicos que permitan su estudio de una forma más completa (esto es, eliminándolas, sorteándolas, transfiriéndolas, etc.). Nuestro conocimiento del papel o papeles que juegan los linfocitos T DN se asienta en ocasiones en evidencia de hace más de veinte años, mientras que la Inmunología ha avanzado bastante desde entonces. La ontogenia, fisiología y función de las células T DN debería ser revisada con nuevas herramientas y perspectivas. La existencia de este desfase se puede ilustrar con al menos dos ejemplos. Primero, se cree que las células T DN de pacientes con LES pueden apoyar a las células B en la producción de anticuerpos²⁸⁸. Quizá ello sea cierto³²², pero esa evidencia única es cuestionada por un descubrimiento posterior que demuestra que las células T DN ayudando a los linfocitos B son seleccionadas por CD1c y que por tanto pertenecen a una subpoblación de NKT³³⁸. La segunda observación fue mencionada anteriormente en relación al papel de los linfocitos T DN durante la infección por un determinado patógeno. Se

consideraba que estas células eran importantes en la respuesta contra *F. tularensis*²⁹², pero más adelante se descubrió que estos linfocitos T DN eran en realidad células MAIT¹⁷⁹. Subcategorías dentro de las células T DN podrían asimismo explicar los hallazgos aparentemente contradictorios. En este sentido, mientras que Cong y colegas²⁶⁶ han observado que las células T DN reguladoras requieren IL-2 para promover su capacidad reguladora, un estudio con ratones propensos al desarrollo de autoinmunidad de tipo lupus mostro que la IL-2 inducía una reducción en la proporción de células T DN pro-inflamatorias³⁰⁶.

Además, la carencia de marcadores específicos (especialmente marcadores positivos, ya que generalmente las células T DN se definen mediante la exclusión de otros subtipos leucocitarios) y de herramientas para estudiar los linfocitos T DN, junto al hecho de que se trata de una población pequeña de células, convierte el estudio de estas células en cierta medida en un reto. Ello ha llevado a muchos grupos de investigación a estudiar a las células T DN en modelos donde éstas son anormalmente abundantes, esto es, cepas de ratones con las mutaciones *lpr* y *gld*. Sin embargo, el hecho de que estos ratones tienen un importante defecto en tolerancia periférica y apoptosis, de que no comprendemos completamente las funciones alternativas de Fas y FasL, y de que la acumulación de las células T DN no parece depender del defecto en apoptosis²³⁹ puede, en algunos casos, haber arrojado resultados poco relevantes para la fisiología. De esto se deriva la necesidad de esclarecer el papel de las células T DN en individuos sanos.

En resumen, para comprender mejor el rol y fisiología de las células T DN y determinar si son importantes en autoinmunidad, respuesta inmune a patógenos o inmunoregulación, es necesario que los linfocitos T DN reciban una subclasificación apropiada y que sean tratadas

como lo son las células CD4, CD8, MAIT o NKT, en términos conceptuales y técnicos, de forma que los nuevos resultados generados puedan proporcionar un mejor entendimiento sobre estas células.

II. Hipótesis y Objetivo

Las células TCR- $\alpha\beta^+$ CD4 $^-$ CD8 $^-$ (células T doble negativas; DN) representan una fracción mínima de la población de células T en sangre y tejidos linfoides periféricos. Debido parcialmente a ello, así como a la ausencia de posibles marcadores que permitan distinguir entre diferentes subpoblaciones, son un grupo celular del que se conoce relativamente poco.

Múltiples evidencias indican que las células T DN presentan un fenotipo y un perfil funcional pro-inflamatorio y que se encuentran aumentadas en diversas enfermedades autoinmunes como el lupus eritematoso sistémico (quizá contribuyendo a la patología asociada), asociación que hace necesario el estudio de los linfocitos T DN.

Por todo esto, la hipótesis planteada en esta Tesis Doctoral es que las células T DN son células autorreactivas que proceden de linfocitos T CD8 $^+$ y que se encuentran quiescentes en condiciones normales, pero que pueden expandirse en condiciones y síndromes autoinmunes y contribuir a la patogenia de estas enfermedades.

El objetivo global de esta Tesis Doctoral es estudiar la posible naturaleza autorreactiva de las células T doble negativas (DN), definir ciertos aspectos de su ontogenia e identificar posibles marcadores que definan subtipos de células DN. Para ello se plantean los siguientes objetivos particulares:

1. Investigar mediante el uso de modelos murinos de células T con TCR transgénicos, si la acumulación y formación de células T DN es dependiente de la presencia de antígenos propios.
2. Estudiar si la formación de los linfocitos T DN depende de antígenos exógenos.
3. Determinar si las células T DN pueden derivar de la activación de células CD8 o CD4.
4. Explorar las capacidades supresoras y pro-inflamatorias de células T DN.

5. Definir el fenotipo y posibles marcadores celulares que identifiquen a los linfocitos T DN autorreactivos.
6. Comprobar la existencia de células T DN autoreactivas en un repertorio policlonal de células T en condiciones normales.
7. Examinar si los linfocitos T DN autorreactivos están expandidos en modelos murinos de enfermedades autoinmunes.
8. Determinar si las células DN autoreactivas pertenecen a otros subtipos celulares como las células NKT y MAIT.
9. Determinar si las células T DN dependen de la presencia de microbiota.

III. Publicaciones

Capítulo 1

Programmed cell death 1 and Helios distinguish TCR- $\alpha\beta$ + double-negative (CD4-CD8-) T cells that derive from self-reactive CD8 T cells

Noé Rodríguez-Rodríguez, Sokratis A. Apostolidis, Pablo Penaloza-MacMaster, José Manuel Martín-Villa, Dan H. Barouch, George C. Tsokos & José C. Crispín.

***The Journal of Immunology*, 194(9): 4207-14. 2015**

Copyright 2015. The American Association of Immunologists, Inc.

Programmed Cell Death 1 and Helios Distinguish TCR- $\alpha\beta^+$ Double-Negative (CD4 $^-$ CD8 $^-$) T Cells That Derive from Self-Reactive CD8 T Cells

Noé Rodríguez-Rodríguez,^{*,†} Sokratis A. Apostolidis,^{*} Pablo Penaloza-MacMaster,[‡] José Manuel Martín Villa,[†] Dan H. Barouch,^{‡,§} George C. Tsokos,^{*} and José C. Crispín^{*}

TCR- $\alpha\beta^+$ double-negative (DN; CD4 $^-$ CD8 $^-$) T cells represent a poorly understood cellular subset suggested to contribute to the pathogenesis of the autoimmune disease systemic lupus erythematosus. DN T cells have been proposed to derive from CD8 $^+$ cells. However, the conditions that govern the loss of CD8 expression after Ag encounter are unknown. In this study, we tracked the fate of CD8 T cells from transgenic TCR mice exposed to their cognate Ags as self or in the context of infection. We demonstrate that CD8 T cells lose CD8 expression and become DN only when cognate Ag is sensed as self. This process is restricted to tissues where the Ag is present. We also show that DN T cells derived from self-reactive CD8 cells express the inhibitory molecules PD-1 and Helios. These molecules identify a subset of DN T cells in normal mice. A similar population expands when CD8 T cells from repertoires enriched in self-reactive cells (Aire-deficient) are transferred into cognate hosts. Collectively, our data suggest that a subset of DN T cells, identified by the expression of PD-1 and Helios, represent self-reactive cells. Our results provide an explanation for the origin of DN T cells and introduce CD8 loss as a process associated with self-Ag encounter. *The Journal of Immunology*, 2015, 194: 4207–4214.

Among the T cells that display an $\alpha\beta$ TCR, CD4 helper cells and CD8 cytotoxic cells represent the two major populations. T cells that lack CD4 and CD8 (double-negative; DN) comprise a third, poorly understood subset. DN T cells expand in certain autoimmune and inflammatory conditions, such as systemic lupus erythematosus (SLE) (1) and autoimmune lymphoproliferative syndrome (2), where they have been proposed to play a pathogenic role (1, 3). DN T cells that possess regulatory properties have also been described, mainly in the setting of allogeneic transplantation models (4).

The ontogeny of DN T cells is not well established. Previous studies have suggested that they originate through a thymus-independent process (5, 6). However, several lines of evidence strongly support the hypothesis that DN T cells arise from activated

thymic-derived CD4 $^+$ (7, 8) or CD8 $^+$ cells (9–11). Mice deficient in β_2 -microglobulin have reduced numbers of DN T cells, suggesting that their generation depends on class I MHC molecules (12). Moreover, the *Cd8a* locus is hypomethylated in DN T cells, indicating previous transcriptional activity (13, 14). Downregulation of CD8 has been described in cells that fail to receive survival signals from MHC class I molecules (15) or after in vivo TCR ligation in *Fas^{lpr}* mice (16). In addition, we have shown that a fraction of human CD8 T cells downregulate CD8 after activation (11). Finally, a transient downregulation of CD8 is induced during immune responses to pathogens (17), and a reduction in CD8 levels has been described as a consequence of CD8 T cells undergoing peripheral tolerance (18, 19). However, the conditions that govern the loss of CD8 expression after Ag encounter and whether cells that lost CD8 expression exist within the DN T cell population of normal mice remain unknown.

Because DN T cells and, in particular, the process whereby T cells lose CD8 expression and become DN may be of importance in the setting of autoimmune and inflammatory diseases, we studied CD8 T cell activation during in vivo immune responses to Ags presented as self or foreign. We demonstrate that in normal mice, loss of CD8 expression occurs only after exposure to self-Ag in organs where the Ag is expressed. The phenotype of CD8-derived DN cells is characterized by high levels of expression of programmed cell death 1 (PD-1) and Helios, features shared by a subset of naturally occurring DN T cells found in unmanipulated mice. Collectively, we demonstrate that a subset of DN T cells represents self-reactive cells that have lost CD8 expression after activation in the periphery. The expansion of the DN T cell compartment in patients with SLE further supports the role of this process in maintaining immune tolerance.

Materials and Methods

Mice

OT-I, CD45.1, OT-II, Thy1.1, mOVA, mice that express mOVA under the control of the rat insulin promoter (RIP-mOVA), Rag-1 $^{-/-}$, Foxp3 GFP reporter mice, and B6 mice were purchased from The Jackson Laboratories. HY mice were a generous gift of Dr. Welsh (University of Massachusetts).

^{*}Division of Rheumatology, Department of Medicine, Beth Israel Deaconess Medical Center and Harvard Medical School, Boston, MA 02215; [†]Departamento de Immunología, Facultad de Medicina, Universidad Complutense de Madrid, Madrid, 28040, Spain; [‡]Center for Virology and Vaccine Research, Beth Israel Deaconess Medical Center, Harvard Medical School, Boston, MA 02215; and [§]Ragon Institute of MGH, MIT and Harvard, Cambridge, MA 02139

Received for publication October 30, 2014. Accepted for publication March 1, 2015.

This work was supported by the Public Health Service, National Institutes of Health (Grant R21 AR063262 to J.C.C. and Grant R01 AI085567 to G.C.T.), a grant from the Alliance for Lupus Research (to J.C.C.), and a postdoctoral fellowship from the Arthritis Foundation (to S.A.A.).

Address correspondence and reprint requests to Dr. José C. Crispín at the current address: Department of Immunology and Rheumatology, Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán, Vasco de Quiroga 15, Tlalpan, Mexico City 14000, Mexico, or Prof. George C. Tsokos, Department of Medicine, Division of Rheumatology, Beth Israel Deaconess Medical Center and Harvard Medical School, 330 Brookline Avenue, CLS-937, Boston, MA 02215. E-mail addresses: carlos.crispin@incmnsz.mx (J.C.C.) or gtsokos@bidmc.harvard.edu (G.C.T.)

The online version of this article contains supplemental material.

Abbreviations used in this article: DN, double-negative; LAG-3, lymphocyte activation gene 3 protein; LM-OVA, OVA-expressing *Listeria monocytogenes*; mOVA-RIP mice, mice that express mOVA under the control of the rat insulin promoter; SLE, systemic lupus erythematosus.

Copyright © 2015 by The American Association of Immunologists, Inc. 0022-1767/15/\$25.00

Aire-deficient mice were described previously (20). Mice (8–12 wk of age) were bred and housed in a specific pathogen-free facility. All procedures were performed in accordance to National Institutes of Health guidelines and approved by the Institutional Animal Care and Use Committee of the Beth Israel Deaconess Medical Center.

Adoptive transfers, immunizations, and infections

For adoptive transfers, HY, OT-I.CD45.1, OT-II.Thy1.1, or Aire^{+/+}Aire^{-/-} mice were used as donors. T cells were isolated using Dynabeads (Invitrogen) from spleen and lymph nodes (purity $\geq 95\%$). When indicated, T cells were sorted in a FACSaria II. Zombie NIR staining (Biolegend) or SYTOX Orange (Invitrogen) were used to exclude dead cells. CFSE labeling was performed as previously described (11). A total of $2\text{--}6 \times 10^6$ cells were transferred by tail-vein injection. Mice were immunized by i.p. injection with SIINFEKL in PBS with Alum (Thermo Scientific). Mice were infected with 10^4 CFU OVA-expressing *Listeria monocytogenes* (LM-OVA; a generous gift from Dr. Bevan from the University of Washington) i.v. 2 d after T cell transfer. To analyze the effect of adjuvant, we injected $50 \mu\text{g}$ LPS i.p. into recipient mice 6 h before adoptive transfer of OT-I cells.

Flow cytometry

Pancreas, kidneys, and livers were processed as previously described (21). Abs were from Biolegend or eBioscience. In adoptive transfer experiments, donor cells were identified using double staining for congenic markers (e.g., BV421-labeled anti-CD45.1 and allophycocyanin/Cy7-labeled anti-CD45.1) and Abs against the transgenic TCR (OT-I:anti-V α 2/anti-V β 5; HY:anti-HY-TCR, T3.70). To analyze cytokine production, we stimulated cells with PMA and ionomycin during 5–7 h in the presence of brefeldin A. Intracellular staining was performed using the Cytofix/Cytoperm Kit (BD).

In vitro recall response and suppression assay

CD8 or DN OT-I T cells were sorted from spleens, labeled with CFSE, and stimulated with OVA-pulsed irradiated splenocytes or plate-bound anti-CD3 and anti-CD28 (2 $\mu\text{g}/\text{ml}$). Cell proliferation was quantified 3 d later. To assess suppressive capacity, we sorted OT-I DN T cells from spleens of mOVA mice 7 d after the transfer of OT-I CD8 cells. OT-I DN T cells or CD4 FoxP3⁺ T cells sorted from Foxp3^{GFP} reporter mice were cocultured at different ratios with naive CD4 OT-II Thy1.1 cells labeled with CFSE. Cells were stimulated with anti-CD3 and irradiated splenocytes. Proliferation of Thy1.1 cells was assessed by flow cytometry after 4 d.

Statistical analyses

Data from independent experiments were analyzed using Student *t* test, Mann–Whitney *U* test, or one-way ANOVA (followed by Bonferroni posttest) using GraphPad Prism. Results are expressed as mean \pm SEM.

Results

DN T cells are generated after they encounter self-Ag in the periphery

Early work studying central tolerance using mice that express transgenic TCRs showed that when the cognate Ag is presented as self, most thymocytes are deleted by negative selection. However, when the TCR is restricted by class I MHC, a relatively large proportion of the cells that exit the thymus bearing the transgenic TCR lack CD4 and CD8 (22). The HY transgenic TCR (HY) is specific for an Ag encoded in chromosome Y presented by MHC class I molecules (22). In female mice, HY T cells exit the thymus as CD8 T cells. In contrast, in male mice, where the cognate Ag is presented as self, a majority of HY T cells in peripheral lymphoid organs are DN. We confirmed these results in HY mice (Fig. 1A and 1B) and observed a similar phenomenon when OT-I TCR mice were crossed with animals that ubiquitously express the OT-I cognate Ag chicken OVA (mOVA mice; Fig. 1C and 1D) (23). Because transgenic TCRs are expressed earlier than endogenous TCRs, at the DN thymocyte stage (24), reports have suggested that the DN T cells found in peripheral lymphoid organs of HY mice result from an abnormal thymic selection process where precocious positive signals promote the selection of T cells with properties similar to TCR- $\gamma\delta^+$ cells (25, 26) or favor the selection of CD8 $\alpha\alpha$ cells that become intraepithelial lymphocytes (27). To avoid this confounding factor

and to determine whether self-Ag expression in the periphery contributes to the loss of CD8 expression in Ag-specific T cells, we performed adoptive transfer experiments using naive HY T cells. For this, CD8⁺ T cells were isolated from spleen and lymph nodes of HY female mice and transferred into male or female B6 congenic mice. The purity of transferred T cells and the gating strategy used to distinguish the adoptively transferred cells from those of the recipient are detailed in Supplemental Fig. 1A and 1B. As shown in Figure 1E and 1F, a large fraction ($\sim 40\%$) of CD8 T cells that were transferred into Ag-expressing (male) mice lost the CD8 molecule and became DN. This was Ag driven, because it was not observed when the cells were transferred into female mice. To ensure that no cells from the recipient mice were included in the gates that defined donor cells, we used cells from mice that had received only PBS to set the gates. As shown in Supplemental Fig. 1C, no HY-TCR CD45.2⁺ cells were observed in the sham-injected mice. When total HY T cells (including CD8 and preformed DN T cells) were injected into female mice, no proliferation was observed in CD8 or DN cells and the ratio of DN/CD8 remained the same throughout 10 d. When the cells were transferred into male B6 mice, the CD8 cells had robustly divided by day 3, when no division was observed in the DN cells. By day 5, a population of DN T cells that had the same amount of CFSE as the divided CD8 cells was detected, suggesting that CD8 T cells were downregulating the CD8 molecule. By day 10, a majority of the cells were DN. A CFSE^{high} DN population corresponding to the initially transferred DN cells remained unchanged throughout the experiment. These data indicate that DN T cells do not proliferate upon Ag encounter and suggest that the DN cells that appear between days 5 and 10 represent CD8 T cells that have lost CD8 expression after proliferating (Supplemental Fig. 1D).

To further confirm these findings, we isolated OT-I CD8 T cells and transferred them into mOVA mice (Fig. 2A and Supplemental Fig. 2A–C). OT-I T cells vigorously proliferated and upregulated CD44 upon Ag encounter. Approximately 40% had lost CD8 expression by day 7 after the transfer (Fig. 2B and Supplemental Fig. 2D). As a result of Ag stimulation, OT-I cells downregulated the TCR to a variable extent, as reported previously (28). CD8 loss was more pronounced in cells that downregulated the TCR to a lesser extent (Supplemental Fig. 2E). CD8 loss was not transient, and similar proportions of CD8 and DN T cells were found at day 14 posttransfer (Fig. 2B). A time course showed that DN T cells peaked at day 7 after transfer and were still detected at day 30 (Supplemental Fig. 2F). CD8 expression was maintained and proliferation was minimal in T cells transferred into B6 mice (Fig. 2B).

To rule out the possibility that DN T cells were originating from the expansion or survival of DN cells contaminating the transferred CD8 population, we performed experiments using naive CD8 cells FACS-sorted from Rag-1^{-/-} OT-I mice (Supplemental Fig. 2G). As in previous experiments, CD8 cells became activated and a population of OT-I DN T cells was observed at day 10 after transfer (Supplemental Fig. 2H and 2I). Coreceptor downregulation was only observed in CD8 T cells; OVA-specific CD4 OT-II cells transferred into mOVA mice did not lose CD4 expression, despite becoming activated as indicated by CD44 upregulation (Fig. 2C).

To investigate whether Ag encounter could promote CD8 loss regardless of the context of presentation, we transferred OT-I CD8 T cells into congenic B6 mice and immunized them with the OVA-derived peptide SIINFEKL emulsified in alum. We did not observe CD8 conversion into DN T cells despite OT-I T cells proliferating after Ag encounter (Supplemental Fig. 3A). To analyze the expression of CD8 throughout an in vivo immune response against a pathogen, we transferred OT-I CD8 T cells into B6 mice and infected them with LM-OVA (Fig. 2D). As expected, OT-I cells

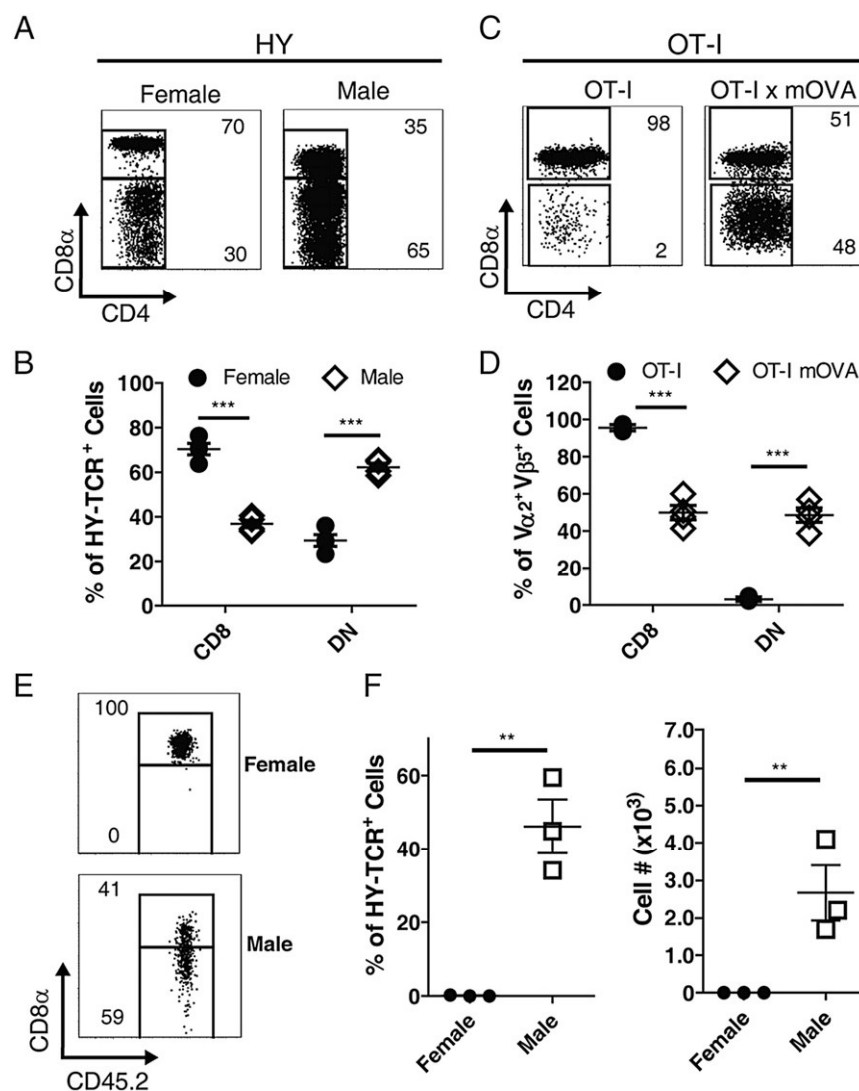


FIGURE 1. Exposure to self-Ag induces loss of CD8 expression. **(A)** Percentage of CD8 and DN T cells within HY-specific T cells (identified by the T3.70 mAb) in spleens of female and male HY mice. **(B)** Cumulative data from **(A)**. **(C)** OT-I (V α 2⁺V β 5⁺) T cells were analyzed for the presence of CD8 and DN T cells among splenocytes from OT-I or OT-I.mOVA mice. **(D)** Cumulative data from **(C)**. **(E)** Analysis of CD8 expression in HY⁺ T cells (CD45.2) 10 d after their transfer into female or male mice (CD45.1). **(F)** Cumulative data from **(E)**, shown as percentage and absolute numbers of DN T cells. Data are representative of two or three independent experiments with $n \geq 3$. ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

proliferated postinfection (Fig. 2E). Nevertheless, expression levels of CD8 were maintained and no DN T cells were observed at days 7 and 14 (Fig. 2E). The ratio of DN/CD8 cell number in B6 mice, in mice infected with LM-OVA, and in mOVA mice are presented in Fig. 2F. The differences in CD8 stability between OT-I cells exposed to Ag as self or in the context of infection could not be explained by lack of T cell activation because CD44 was induced in OT-I cells regardless of the context of Ag exposure (Supplemental Fig. 3B).

So far our data suggested that CD8 loss could occur as a consequence of self-Ag encounter or as a result of Ag presentation in the absence of inflammation. We injected LPS into mOVA mice 6 h before performing the adoptive transfer of OT-I CD8 T cells to determine whether the presence of an adjuvant would affect CD8 downregulation. As shown in Supplemental Fig. 3C and 3D, presence of LPS did not affect significantly the response.

CD8 loss occurs only in tissues where the Ag is expressed

mOVA mice express OVA as a ubiquitous Ag. To determine whether the pattern of Ag expression impacts the generation of DN T cells, we transferred OT-I cells into RIP-mOVA mice. In these mice, mOVA expression is restricted to the pancreatic β cells and kidney proximal tubular cells (29). OT-I cells transferred into RIP-mOVA hosts are tolerized after an initial activation phase and do not cause immunopathology (30–32). Ten days after transfer of OT-I CD8 T cells,

we harvested the pancreas, kidneys, spleen, and liver of RIP-mOVA mice and assessed the infiltration of donor cells and their expression of CD8. As shown in Fig. 3A, OT-I cells infiltrated the pancreas and kidneys only when OVA was locally expressed. OT-I cells recovered from RIP-mOVA mice had proliferated in OVA-expressing tissues and in the spleen and liver. Interestingly, CD8 expression was lost only in cells found in the pancreas and kidneys, suggesting that CD8 conversion into DN cells is promoted by the local expression of cognate self-Ag (Fig. 3B–D).

DN T cells induced by self-Ag do not display regulatory capacities

To gain insight into the functional properties of DN T cells induced by exposure to self-Ag, we performed an in vitro recall response assay. CD8 and DN OT-I cells were sorted from mOVA mice 7 d after the adoptive transfer of CD8 cells. Cells were stimulated with OVA-pulsed APCs or with anti-CD3 and anti-CD28. As shown in Supplemental Fig. 3E, both CD8 and DN T cells recovered from mOVA mice failed to proliferate. In contrast, CD8 OT-I T cells from mice immunized with OVA in alum proliferated vigorously with both stimuli. These results are in accordance with a previous report that show that transfer of OT-I T cells into mOVA mice results in tolerance (33) and with the fact that transferred HY DN T cells failed to proliferate in male mice (Supplemental Fig. 1D). To analyze whether DN T cells induced by self-Ag possess regulatory

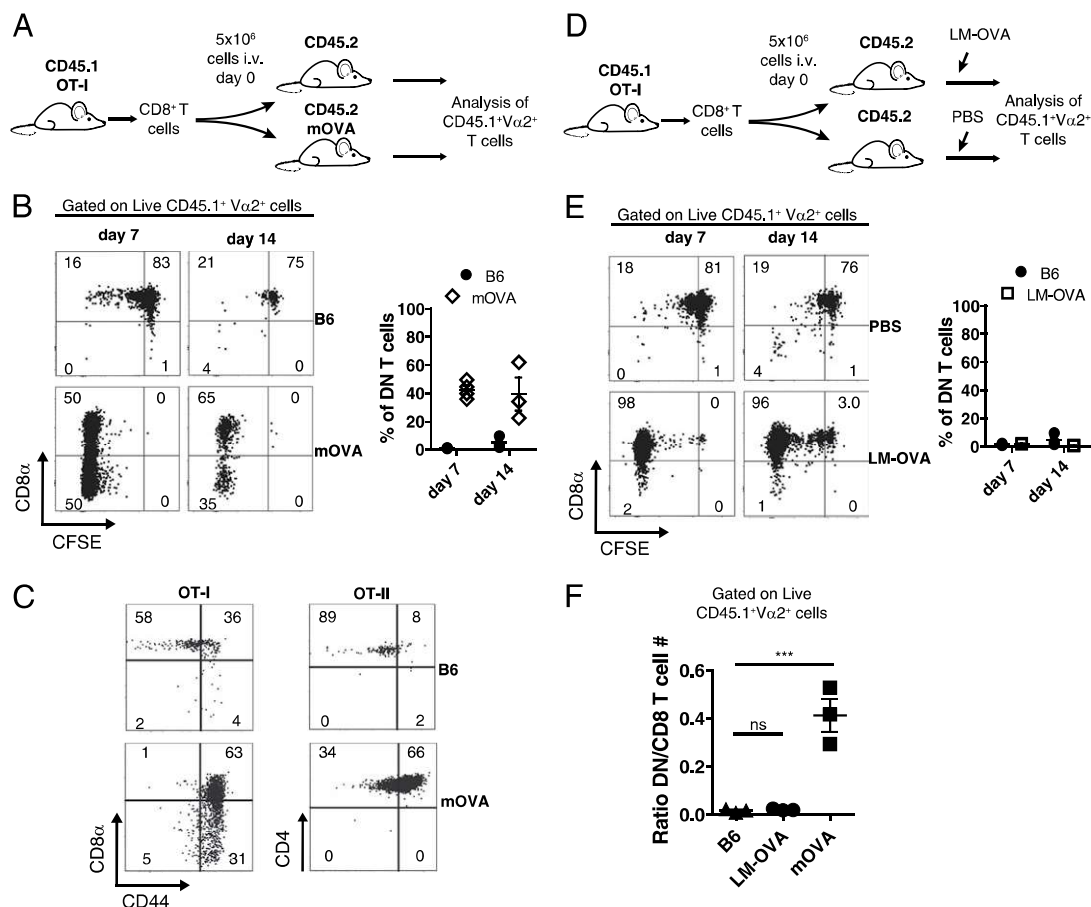


FIGURE 2. Ag exposure induces DN T cells only when presented as self. CD8 T cells from OT-I.CD45.1 mice were transferred into B6 or mOVA mice (A), and percentages of CD8⁺ and DN Vα2⁺ T cells were quantified at days 7 and 14 after transfer (B). Proliferation was measured by CFSE dilution. (C) Analysis of coreceptor and CD44 expression in donor T cells 10 d after transfer of CD8⁺ T cells from OT-I.CD45.1 mice or CD4⁺ T cells from OT-II.Thy1.1 mice into B6 or mOVA (CD45.2.Thy1.2) mice. (D) CD8⁺ T cells from OT-I.CD45.1 mice were transferred into B6 mice and infected by i.v. injection with 10⁴ CFU LM-OVA. (E) Donor (CD45.1⁺Vα2⁺) cells were analyzed for CD8 expression and proliferation (right panels), and percentage of DN T cells quantified (left panel) 7 and 14 d postinfection. (F) Cumulative data showing the ratio of DN/CD8 T cell absolute numbers in B6 mice, in mice infected with LM-OVA (day 10 after transfer of CD8 OT-I cells), or in mOVA mice (day 10 after transfer of CD8 OT-I cells). Data are representative of two or three independent experiments with $n \geq 3$. *** $p < 0.001$.

capacity, we performed in vitro suppression assays. To this end, we sorted DN OT-I T cells from mOVA mice and, as positive controls, CD4 FoxP3⁺ cells from Foxp3^{GFP} reporter mice. DN or CD4 FoxP3⁺ cells were incubated at different ratios with OT-II CD4 T cells stimulated with anti-CD3 and irradiated splenocytes. As shown in Supplemental Fig. 3F, DN cells did not suppress proliferation of CD4 T cells at any DN/Teff ratio. In contrast,

CD4 FoxP3⁺ cells suppressed in a dose-responsive manner. In accordance with these results, DN T cells failed to produce IL-10 and TGF-β1 (Supplemental Fig. 3G).

To understand the effect of self-Ag encounter on cytokine production, we compared the secretion of IFN-γ and IL-17A by OT-I CD8 T cells from mice infected with LM-OVA and by CD8 and DN OT-I T cells from mOVA mice harvested 10 d after

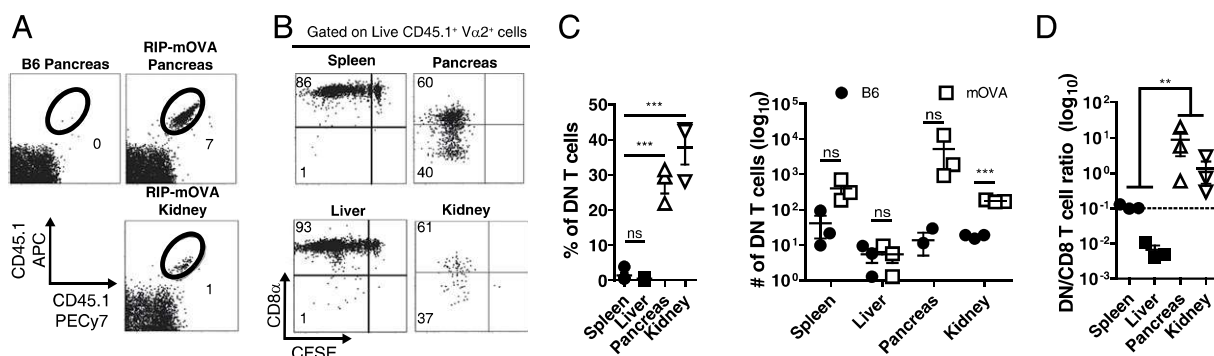


FIGURE 3. DN T cells arise only in tissues that express cognate self-Ag. (A) Organ-infiltrating leukocytes were analyzed for the presence of Vα2⁺ donor (CD45.1⁺) cells in B6 or RIP-mOVA mice. (B) CD8 expression levels and proliferation of CD45.1⁺Vα2⁺OT-I donor cells infiltrating spleen, liver, pancreas, and kidneys of RIP-mOVA mice 10 d after transfer. (C) Cumulative data from (B), expressed as percentage or absolute numbers. (D) Ratio of DN/CD8 cells in different organs of RIP-mOVA mice. Data are representative of two or three independent experiments with $n \geq 3$. ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

transfer of CD8 OT-I cells. We decided to measure IL17A because DN T cell found in mice and humans produce significant amounts of IL-17 (1, 3, 34). As shown in Fig. 4, cells from infected mice produced copious amounts of IFN- γ and virtually no IL-17A. IFN- γ production by CD8 OT-I cells recovered from mOVA mice did not differ, but a relatively high fraction of the cells produced IL-17A. In contrast, IFN- γ production was significantly reduced in DN OT-I cells from mOVA mice and ~20% of them were IL-17A⁺. The expression of T-bet and ROR- γ t in these cell subsets paralleled their cytokine profile: CD8 cells from LM-OVA-infected mice had high levels of T-bet and no ROR- γ t expression. In comparison, T-bet levels were reduced in CD8 and DN cells recovered from mOVA mice, and ROR- γ t levels tended to be higher in these cells (Fig. 4B). It is important to note that when CD8 and DN T cells from mOVA mice were rechallenged with OVA, no cytokine production was detected (data not shown). Therefore, their capacity to produce IL-17A and IFN- γ may be evident only when stimulated with PMA plus ionomycin.

In concordance to the previous results, ex vivo analysis of cytokine production by CD8 and DN cells recovered after transfer into RIP-mOVA mice showed that a large fraction of cells harvested from Ag-expressing organs (e.g., pancreas) was IL-17A⁺ (Supplemental Fig. 3H).

Self-reactive DN T cells display PD-1 and Helios

When OT-I cells are adoptively transferred into mOVA or RIP-mOVA mice, they become unresponsive and fail to induce immunopathology (30–33, 35). Therefore, we analyzed whether DN T cells derived from self-reactive CD8 cells express molecules

implicated in self-reactive T cell tolerance. PD-1 and CTLA-4 are inhibitory receptors that control the expansion of self-reactive and activated T cells (36–38). DN T cells generated by exposure to self-Ag in mOVA mice expressed high levels of PD-1 (Fig. 5A). In contrast, CTLA-4 expression was not observed (Fig. 5A). Recent work has shown that the transcription factor Helios (encoded by *Irf2*) is expressed by T cells undergoing central and peripheral tolerance (39). In line with the upregulation of PD-1, OT-I DN T cells recovered from mOVA mice displayed high levels of Helios (Fig. 5A). Expression of the exhaustion-associated molecules 2B4 (CD244, SLAMF4) and Lymphocyte activation gene 3 protein (LAG-3) (40) was not induced in DN T cells transferred into mOVA mice (Fig. 5B). The same observation was made when Rag1-deficient OT-I CD8 T cells were transferred into mOVA mice (Supplemental Fig. 2J).

These results suggest that expression of PD-1 and Helios identifies a population of self-reactive DN T cells. To determine whether this population is present in normal, unmanipulated mice, we analyzed the distribution of PD-1 and Helios in DN T cells from B6 mice (CD3⁺ TCR- $\alpha\beta$ ⁺ NK1.1[−] CD49b[−] CD4[−] CD8[−]). As shown in Fig. 5C, 38 \pm 3 and 55 \pm 4% of DN T cells expressed PD-1 and Helios, respectively. We confirmed the absence of NKT cells by CD1d tetramer staining (Supplemental Fig. 4A). These results suggest that among DN T cells that are a heterogeneous subset, expression of Helios and PD-1 may identify a subset of DN cells that derive from self-reactive CD8 cells.

Self-reactive CD8 T cells from nonrestricted T cell repertoires convert to DN cells

We aimed to test the hypothesis that Helios and PD-1 distinguish DN T cells derived from self-reactive CD8 cells in mice with nontransgenic TCRs. We reasoned that more DN T cells expressing PD-1 and Helios would be generated by CD8 T cells obtained from mice enriched in self-reactive cells. For this purpose, we studied mice deficient in the transcriptional regulator Aire (20) (Fig. 6A). In Aire-deficient mice (*Aire*^{−/−}), thymic negative selection is incomplete, allowing the survival of more self-reactive T cells that

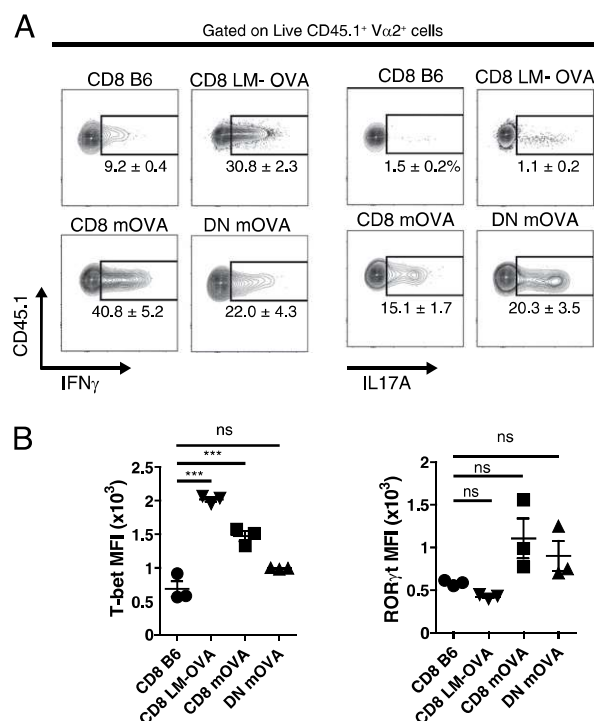


FIGURE 4. Self-reactive DN T cells produce IL-17. **(A)** Production of IFN- γ and IL-17A was analyzed in CD8 and DN T cells obtained 10 d after the transfer of CD8 OT-I T cells into B6 mice (CD8), into B6 mice infected with LM-OVA (CD8), and into mOVA mice (CD8 and DN). Cells were stimulated (PMA and ionomycin) for 5–7 h in the presence of brefeldin A and stained for intracellular cytokines. The numbers under the gates represent mean \pm SEM. **(B)** T-bet and ROR- γ t expression were measured by intracellular flow cytometry in cells from the mice described in (A). Data are representative of three independent experiments with $n = 3$. *** $p < 0.001$.

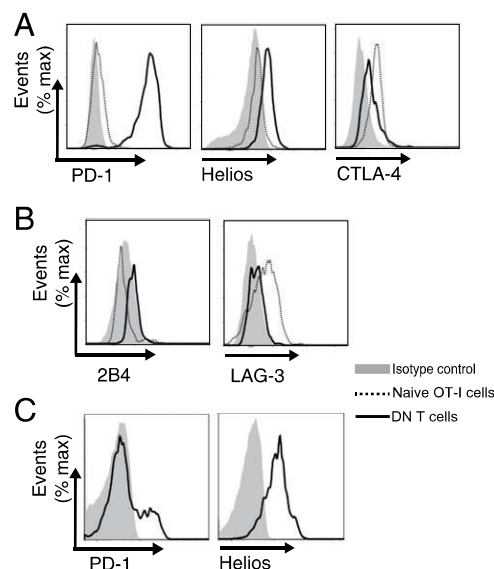


FIGURE 5. A fraction of naturally occurring DN T cells express Helios and PD-1. **(A)** Expression of PD-1, Helios, and CTLA-4 in DN T cells recovered from mOVA mice 10 d after transfer. **(B)** Expression of 2B4 and LAG-3 in self-reactive DN T cells from (A). **(C)** Expression of PD-1 and Helios in TCR- $\alpha\beta$ ⁺ NK1.1[−] DN T cells from spleens of B6 mice. Data are representative of two or three independent experiments with $n \geq 3$.

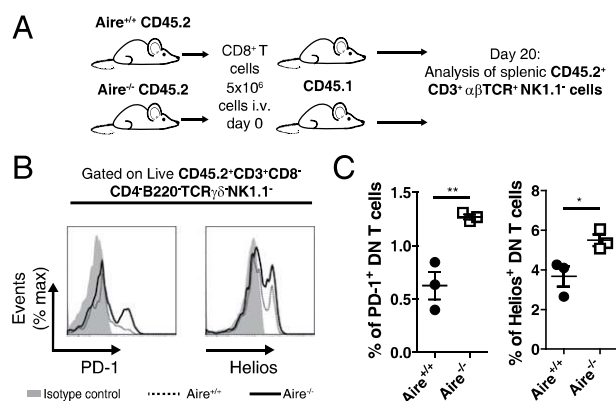


FIGURE 6. Generation of PD-1 and Helios-expressing DN T cells is increased when CD8 T cells derive from mice with defective negative selection. **(A)** Aire-sufficient or -deficient CD45.2⁺ CD8 T cells were transferred into CD45.1 mice. **(B)** Analysis of PD-1 and Helios expression in CD45.2⁺ DN T cells from Aire^{+/+} or Aire^{-/-} mice. **(C)** Percentage of DN PD-1⁺ or DN Helios⁺ cells among CD45.2⁺ CD3⁺ TCRαβ⁺ T cells. Data are representative of three independent experiments with $n \geq 3$ per group. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

escape central tolerance and egress to peripheral organs. We compared the fraction of DN T cells that expressed Helios and PD-1 after transfer of CD8 T cells from Aire-deficient or sufficient mice into congenic wild type hosts. Although the number of DN T cells generated upon adoptive transfer of Aire-sufficient and -deficient CD8 cells was not different (Supplemental Fig. 4B–D), Aire-deficient CD8 cells gave rise to significantly more PD-1⁺ and Helios⁺ DN T cells (Fig. 6B and 6C). Of note, the transfer of Aire-deficient CD4 T cells was not followed by an increase in DN T cells, further supporting the notion that loss of coreceptor is restricted to CD8⁺ cells even in autoimmune mice (Supplemental Fig. 4E). These data argue in favor of the hypothesis that self-reactive CD8 T cells become PD-1⁺ Helios⁺ DN cells after encountering self-Ag and indicate that this process is not restricted to T cells expressing transgenic TCRs.

Discussion

DN T cells have been ascribed proinflammatory and regulatory roles (1, 4, 41–44) suggesting that they represent a heterogeneous cellular subtype. Several lines of evidence have shown that CD8 T cells may become DN after activation (11, 15, 16), but the extent to which this occurs and the context that promotes it in normal mice was not known. In this study, we provide evidence that demonstrates that CD8 T cells lose CD8 and become DN when they encounter cognate Ag presented as self but not during the course or termination of productive immune responses. DN T cells that derive from CD8 cells display markers associated to functional inactivation and fail to proliferate upon cognate Ag rechallenge. The conversion of CD8 to DN T cells occurs exclusively in organs where the Ag is expressed, suggesting that it is modulated by local factors. DN T cells expressing Helios and PD-1 were generated by the transfer of CD8 T cells, and a subpopulation expressing similar markers was detected in wild type mice, suggesting that a fraction of the DN T cells of normal T cell repertoires may derive from self-reactive CD8 T cells. When we transferred CD8 cells enriched in self-reactive TCRs, by using CD8 cells from Aire-deficient mice, we observed a significant increase in PD-1 and Helios-expressing DN T cells. These results support our hypothesis and rule out the possibility that DN T cell conversion is a phenomenon related to transgenic TCRs.

The downregulation of CD8 has been shown in *in vitro*-stimulated human cells (11, 14) and *in vivo* in mice that have deficient

Fas-mediated apoptosis (16). Although cell activation is considered a triggering event in CD8 downregulation, the relevance of this process was not clear because DN T cells are not observed during conventional immune responses. Some reports have suggested that the cytokine milieu may promote DN generation (10, 45). Our data confirm that T cell activation precedes DN T cell generation and establishes the importance of the context of Ag presentation as the main factor determining whether CD8 expression is maintained or lost. OT-I cells became DN or not, after exposure to the same Ag, depending on whether it was presented as self or as foreign, even in the presence of adjuvant.

Loss of CD8 is concomitant to the acquisition of a phenotype that denotes Ag exposure, includes a distinct cytokine production profile, and displays signs of functional inactivation. PD-1 is a pivotal inhibitory receptor that has been shown to control the function of T cells in several settings, including self-reactivity (36) and chronic Ag exposure (46, 47). Because PD-L1 is promiscuously expressed by parenchymal cells (48), it is plausible that signals received through PD-1 play a role in defining whether a CD8 cell will become DN after activation. The fact that OT-I cells only became DN in tissues where the Ag is expressed by parenchymal cells suggests that local presentation, perhaps in the presence of PD-L1, induces DN cell generation as a protective mechanism against self-reactive CD8 T cells. DN T cells can be found infiltrating tumors (49, 50). Hence, it is possible that DN generation is facilitated in tumors as a mechanism of immune evasion (51). The transcription factor Helios is associated to T cell unresponsiveness (52). The expression of high levels of PD-1 and Helios in DN T cells induced by self-Ag resembles the phenotype of exhausted T cells (53). As in chronic infections, self-Ags are continuously expressed and may therefore induce a process similar to exhaustion. However, differences such as the downregulation of CD8 and the lack of expression of other markers strongly associated with exhaustion (i.e., 2B4, LAG-3) indicate that DN generation constitutes a different process.

CD8 and DN T cells generated after adoptive transfer of CD8 T cells into hosts that express ubiquitously the cognate Ag acquired a different cytokine production profile that CD8 T cells primed in the context of a bacterial infection. In particular, a large fraction of DN cells became producers of IL-17. This finding is in accordance with what we and others have published in other settings, including the autoimmune disease SLE (1, 3, 34). It is tempting to speculate that CD8 T cells acquire the capacity to produce IL-17 when they encounter self-Ag, and that loss of CD8 and upregulation of PD-1 and Helios follows as a mechanism to avoid autoimmunity. Further work is needed to clarify this process.

The importance of DN T cells is exemplified by certain autoimmune diseases, including SLE and Sjögren's syndrome, where DN cells are expanded (1, 44) and have been proposed to play a pathogenic role by us and others (1, 41–43). Our results imply that in healthy individuals, DN T cells are self-reactive cells, rendered inactive by the expression of inhibitory molecules that restrict their function. However, failure in these inhibitory mechanisms may allow them to adopt a proinflammatory behavior and to contribute to autoimmunity. This could be caused by altered T cell signaling (54) or by defects in specific inhibitory mechanisms. For example, an autoimmunity-associated allele of *PDCD1* (55), the gene that encodes PD-1, has been linked to decreased expression and function of PD-1 in patients with SLE (56, 57).

In conclusion, our data suggest that a subset of DN T cells, identified by the expression of PD-1 and Helios, represent self-reactive T cells. These results provide an explanation for the origin of DN T cells and introduce a novel mechanism of peripheral tolerance that regulates the activation of self-reactive CD8 T cells.

Acknowledgments

We thank Drs. Christophe Benoist, Noriyuki Fujikado, and Matthew Meredith for providing critical advice and Aire-deficient mice. We also thank Dr. Florencia Rosetti for technical advice and Christina Ioannidis for editing the manuscript.

Disclosures

The authors have no financial conflicts of interest.

References

- Crispín, J. C., M. Oukka, G. Bayliss, R. A. Cohen, C. A. Van Beek, I. E. Stillman, V. C. Kyttaris, Y. T. Juang, and G. C. Tsokos. 2008. Expanded double negative T cells in patients with systemic lupus erythematosus produce IL-17 and infiltrate the kidneys. *J. Immunol.* 181: 8761–8766.
- Lim, M. S., S. E. Straus, J. K. Dale, T. A. Fleisher, M. Stetler-Stevenson, W. Strober, M. C. Sneller, J. M. Puck, M. J. Lenardo, K. S. Elenitoba-Johnson, et al. 1998. Pathological findings in human autoimmune lymphoproliferative syndrome. *Am. J. Pathol.* 153: 1541–1550.
- Sherlock, J. P., B. Joyce-Shaikh, S. P. Turner, C. C. Chao, M. Sathe, J. Grein, D. M. Gorman, E. P. Bowman, T. K. McClanahan, J. H. Yearley, et al. 2012. IL-23 induces spondyloarthropathy by acting on ROR- γ t⁺ CD3+CD4-CD8-entheseal resident T cells. *Nat. Med.* 18: 1069–1076.
- Zhang, Z. X., L. Yang, K. J. Young, B. DuTemple, and L. Zhang. 2000. Identification of a previously unknown antigen-specific regulatory T cell and its mechanism of suppression. *Nat. Med.* 6: 782–789.
- Ford, M. S., Z. X. Zhang, W. Chen, and L. Zhang. 2006. Double-negative T regulatory cells can develop outside the thymus and do not mature from CD8+ T cell precursors. *J. Immunol.* 177: 2803–2809.
- Albuquerque, A. S., J. G. Marques, S. L. Silva, D. Ligeiro, B. H. Devlin, J. Dutrieux, R. Cheynier, C. Pignata, R. M. Victorino, M. L. Markert, and A. E. Sousa. 2012. Human FOXP1-deficiency is associated with $\alpha\beta$ double-negative and FoxP3+ T-cell expansions that are distinctly modulated upon thymic transplantation. *PLoS ONE* 7: e37042. Available at: <http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0037042>.
- Zhang, D., W. Yang, N. Degauque, Y. Tian, A. Mikita, and X. X. Zheng. 2007. New differentiation pathway for double-negative regulatory T cells that regulates the magnitude of immune responses. *Blood* 109: 4071–4079.
- Grishkan, I. V., A. Ntranos, P. A. Calabresi, and A. R. Gocke. 2013. Helper T cells down-regulate CD4 expression upon chronic stimulation giving rise to double-negative T cells. *Cell. Immunol.* 284: 68–74.
- Hang, L., A. N. Theofilopoulos, R. S. Balderas, S. J. Francis, and F. J. Dixon. 1984. The effect of thymectomy on lupus-prone mice. *J. Immunol.* 132: 1809–1813.
- Erard, F., M. T. Wild, J. A. Garcia-Sanz, and G. Le Gros. 1993. Switch of CD8 T cells to noncytolytic CD8-CD4+ cells that make TH2 cytokines and help B cells. *Science* 260: 1802–1805.
- Crispín, J. C., and G. C. Tsokos. 2009. Human TCR- α β + CD4- CD8- T cells can derive from CD8+ T cells and display an inflammatory effector phenotype. *J. Immunol.* 183: 4675–4681.
- Giese, T., and W. F. Davidson. 1995. In CD8+ T cell-deficient lpr/lpr mice, CD4+ B220+ and CD4+B220- T cells replace B220+ double-negative T cells as the predominant populations in enlarged lymph nodes. *J. Immunol.* 154: 4986–4995.
- Landolfi, M. M., N. Van Houten, J. Q. Russell, R. Scollay, J. R. Parnes, and R. C. Budd. 1993. CD2-CD4-CD8- lymph node T lymphocytes in MRL lpr/lpr mice are derived from a CD2+CD4+CD8+ thymic precursor. *J. Immunol.* 151: 1086–1096.
- Hedrich, C. M., J. C. Crispin, T. Rauen, C. Ioannidis, T. Koga, R. N. Rodriguez, S. A. Apostolidis, V. C. Kyttaris, and G. C. Tsokos. 2014. cAMP responsive element modulator (CREM) α mediates chromatin remodeling of CD8 during the generation of CD3+ CD4- CD8- T cells. *J. Biol. Chem.* 289: 2361–2370.
- Pestano, G. A., Y. Zhou, L. A. Trimble, J. Daley, G. F. Weber, and H. Cantor. 1999. Inactivation of misselected CD8 T cells by CD8 gene methylation and cell death. *Science* 284: 1187–1191.
- Mehal, W. Z., and I. N. Crispe. 1998. TCR ligation on CD8+ T cells creates double-negative cells in vivo. *J. Immunol.* 161: 1686–1693.
- Xiao, Z., M. F. Mescher, and S. C. Jameson. 2007. Detuning CD8 T cells: down-regulation of CD8 expression, tetramer binding, and response during CTL activation. *J. Exp. Med.* 204: 2667–2677.
- Blish, C. A., S. R. Dillon, A. G. Farr, and P. J. Fink. 1999. Anergic CD8+ T cells can persist and function in vivo. *J. Immunol.* 163: 155–164.
- Rocha, B., and H. von Boehmer. 1991. Peripheral selection of the T cell repertoire. *Science* 251: 1225–1228.
- Anderson, M. S., E. S. Venzani, L. Klein, Z. Chen, S. P. Berzins, S. J. Turley, H. von Boehmer, R. Bronson, A. Dierich, C. Benoist, and D. Mathis. 2002. Projection of an immunological self shadow within the thymus by the aire protein. *Science* 298: 1395–1401.
- Sitrin, J., A. Ring, K. C. Garcia, C. Benoist, and D. Mathis. 2013. Regulatory T cells control NK cells in an insulinitis lesion by depriving them of IL-2. *J. Exp. Med.* 210: 1153–1165.
- Kisielow, P., H. Blüthmann, U. D. Staerz, M. Steinmetz, and H. von Boehmer. 1988. Tolerance in T-cell-receptor transgenic mice involves deletion of non-mature CD4+8+ thymocytes. *Nature* 333: 742–746.
- Ehst, B. D., E. Ingulli, and M. K. Jenkins. 2003. Development of a novel transgenic mouse for the study of interactions between CD4 and CD8 T cells during graft rejection. *Am. J. Transplant.* 3: 1355–1362.
- Baldwin, T. A., M. M. Sandau, S. C. Jameson, and K. A. Hogquist. 2005. The timing of TCR α expression critically influences T cell development and selection. *J. Exp. Med.* 202: 111–121.
- Egawa, T., T. Kreslavsky, D. R. Littman, and H. von Boehmer. 2008. Lineage diversion of T cell receptor transgenic thymocytes revealed by lineage fate mapping. *PLoS One* 3: e1512. Available at: <http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0001512#pone-0001512-g005>.
- Kreslavsky, T., H. J. Kim, S. B. Koralov, D. Ghitza, T. Buch, H. Cantor, K. Rajewsky, and H. von Boehmer. 2013. Negative selection, not receptor editing, is a physiological response of autoreactive thymocytes. *J. Exp. Med.* 210: 1911–1918.
- Yamagata, T., D. Mathis, and C. Benoist. 2004. Self-reactivity in thymic double-positive cells commits cells to a CD8 α lineage with characteristics of innate immune cells. *Nat. Immunol.* 5: 597–605.
- Schönrich, G., U. Kalinke, F. Momburg, M. Malissen, A. M. Schmitt-Verhulst, B. Malissen, G. J. Hämmerling, and B. Arnold. 1991. Down-regulation of T cell receptors on self-reactive T cells as a novel mechanism for extrathymic tolerance induction. *Cell* 65: 293–304.
- Kurts, C., W. R. Heath, F. R. Carbone, J. Allison, J. F. Miller, and H. Kosaka. 1996. Constitutive class I-restricted exogenous presentation of self antigens in vivo. *J. Exp. Med.* 184: 923–930.
- Harbers, S. O., A. Crocker, G. Catalano, V. D'Agati, S. Jung, D. D. Desai, and R. Clynes. 2007. Antibody-enhanced cross-presentation of self antigen breaks T cell tolerance. *J. Clin. Invest.* 117: 1361–1369.
- Kurts, C., I. Klebba, G. M. Davey, K. M. Koch, J. F. Miller, W. R. Heath, and J. Floege. 2001. Kidney protection against autoreactive CD8(+) T cells distinct from immunoprivilege and sequestration. *Kidney Int.* 60: 664–671.
- Peng, Y., and K. B. Elkon. 2011. Autoimmunity in MFG-E8-deficient mice is associated with altered trafficking and enhanced cross-presentation of apoptotic cell antigens. *J. Clin. Invest.* 121: 2221–2241.
- Mayerova, D., E. A. Parke, L. S. Bursch, O. A. Odumade, and K. A. Hogquist. 2004. Langerhans cells activate naive self-antigen-specific CD8 T cells in the steady state. *Immunity* 21: 391–400.
- Riol-Blanco, L., V. Lazarevic, A. Awasthi, M. Mitsdoerffer, B. S. Wilson, A. Croxford, A. Waisman, V. K. Kuchroo, L. H. Glimcher, and M. Oukka. 2010. IL-23 receptor regulates unconventional IL-17-producing T cells that control bacterial infections. *J. Immunol.* 184: 1710–1720.
- Kurts, C., H. Kosaka, F. R. Carbone, J. F. Miller, and W. R. Heath. 1997. Class I-restricted cross-presentation of exogenous self-antigens leads to deletion of autoreactive CD8(+) T cells. *J. Exp. Med.* 186: 239–245.
- Keir, M. E., G. J. Freeman, and A. H. Sharpe. 2007. PD-1 regulates self-reactive CD8+ T cell responses to antigen in lymph nodes and tissues. *J. Immunol.* 179: 5064–5070.
- Walunas, T. L., D. J. Lenschow, C. Y. Bakker, P. S. Linsley, G. J. Freeman, J. M. Green, C. B. Thompson, and J. A. Bluestone. 1994. CTLA-4 can function as a negative regulator of T cell activation. *Immunity* 1: 405–413.
- Tivol, E. A., F. Borriello, A. N. Schweitzer, W. P. Lynch, J. A. Bluestone, and A. H. Sharpe. 1995. Loss of CTLA-4 leads to massive lymphoproliferation and fatal multiorgan tissue destruction, revealing a critical negative regulatory role of CTLA-4. *Immunity* 3: 541–547.
- Ross, E. M., D. Bourges, T. V. Hogan, P. A. Gleeson, and I. R. van Driel. 2014. Helios defines T cells being driven to tolerance in the periphery and thymus. *Eur. J. Immunol.* 44: 2048–2058.
- Blackburn, S. D., H. Shin, W. N. Haining, T. Zou, C. J. Workman, A. Polley, M. R. Betts, G. J. Freeman, D. A. Vignali, and E. J. Wherry. 2009. Coregulation of CD8+ T cell exhaustion by multiple inhibitory receptors during chronic viral infection. *Nat. Immunol.* 10: 29–37.
- Shivakumar, S., G. C. Tsokos, and S. K. Datta. 1989. T cell receptor α / β expressing double-negative (CD4-/CD8-) and CD4+ T helper cells in humans augment the production of pathogenic anti-DNA autoantibodies associated with lupus nephritis. *J. Immunol.* 143: 103–112.
- Dean, G. S., A. Anand, A. Blofeld, D. A. Isenberg, and P. M. Lydyard. 2002. Characterization of CD3+ CD4- CD8- (double negative) T cells in patients with systemic lupus erythematosus: production of IL-4. *Lupus* 11: 501–507.
- Kato, H., and A. Perl. 2014. Mechanistic target of rapamycin complex 1 expands Th17 and IL-4+ CD4-CD8- double-negative T cells and contracts regulatory T cells in systemic lupus erythematosus. *J. Immunol.* 192: 4134–4144.
- Alunno, A., F. Carubbi, O. Bistoni, S. Caterbi, E. Bartoloni, B. Bigerna, R. Pacini, D. Beghelli, P. Cipriani, R. Giacomelli, and R. Gerli. 2014. CD4(-) CD8(-) T-cells in primary Sjögren's syndrome: association with the extent of glandular involvement. *J. Autoimmun.* 51: 38–43.
- Apte, S. H., A. Baz, P. Groves, A. Kelso, and N. Kienzle. 2008. Interferon- γ and interleukin-4 reciprocally regulate CD8 expression in CD8+ T cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 105: 17475–17480.
- Wherry, E. J., J. N. Blattman, K. Murali-Krishna, R. van der Most, and R. Ahmed. 2003. Viral persistence alters CD8 T-cell immunodominance and tissue distribution and results in distinct stages of functional impairment. *J. Virol.* 77: 4911–4927.
- Barber, D. L., E. J. Wherry, D. Masopust, B. Zhu, J. P. Allison, A. H. Sharpe, G. J. Freeman, and R. Ahmed. 2006. Restoring function in exhausted CD8 T cells during chronic viral infection. *Nature* 439: 682–687.
- Freeman, G. J., A. J. Long, Y. Iwai, K. Bourque, T. Chernova, H. Nishimura, L. J. Fitz, N. Malenkovich, T. Okazaki, M. C. Byrne, et al. 2000. Engagement of the PD-1 immunoinhibitory receptor by a novel B7 family member leads to negative regulation of lymphocyte activation. *J. Exp. Med.* 192: 1027–1034.
- Prins, R. M., F. Incardona, R. Lau, P. Lee, S. Claus, W. Zhang, K. L. Black, and C. J. Wheeler. 2004. Characterization of defective CD4-CD8- T cells in murine tumors generated independent of antigen specificity. *J. Immunol.* 172: 1602–1611.

50. Voelkl, S., T. V. Moore, M. Rehli, M. I. Nishimura, A. Mackensen, and K. Fischer. 2009. Characterization of MHC class-I restricted TCR α beta+ CD4- CD8- double negative T cells recognizing the gp100 antigen from a melanoma patient after gp100 vaccination. *Cancer Immunol. Immunother.* 58: 709–718.
51. Zou, W., and L. Chen. 2008. Inhibitory B7-family molecules in the tumour microenvironment. *Nat. Rev. Immunol.* 8: 467–477.
52. Doering, T. A., A. Crawford, J. M. Angelosanto, M. A. Paley, C. G. Ziegler, and E. J. Wherry. 2012. Network analysis reveals centrally connected genes and pathways involved in CD8+ T cell exhaustion versus memory. *Immunity* 37: 1130–1144.
53. Wherry, E. J. 2011. T cell exhaustion. *Nat. Immunol.* 12: 492–499.
54. Crispín, J. C., S. N. Liossis, K. Kis-Toth, L. A. Lieberman, V. C. Kytтары, Y. T. Juang, and G. C. Tsokos. 2010. Pathogenesis of human systemic lupus erythematosus: recent advances. *Trends Mol. Med.* 16: 47–57.
55. Prokunina, L., C. Castillejo-López, F. Oberg, I. Gunnarsson, L. Berg, V. Magnusson, A. J. Brookes, D. Tentler, H. Kristjansdóttir, G. Gröndal, et al. 2002. A regulatory polymorphism in PDCD1 is associated with susceptibility to systemic lupus erythematosus in humans. *Nat. Genet.* 32: 666–669.
56. Kristjansdóttir, H., K. Steinsson, I. Gunnarsson, G. Gröndal, K. Erlendsson, and M. E. Alarcón-Riquelme. 2010. Lower expression levels of the programmed death 1 receptor on CD4+CD25+ T cells and correlation with the PD-1.3A genotype in patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 62: 1702–1711.
57. Bertias, G. K., M. Nakou, C. Choulaki, A. Raptopoulou, E. Papadimitraki, G. Goulielmos, H. Kritikos, P. Sidiropoulos, M. Tzardi, D. Kardassis, et al. 2009. Genetic, immunologic, and immunohistochemical analysis of the programmed death 1/programmed death ligand 1 pathway in human systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 60: 207–218.

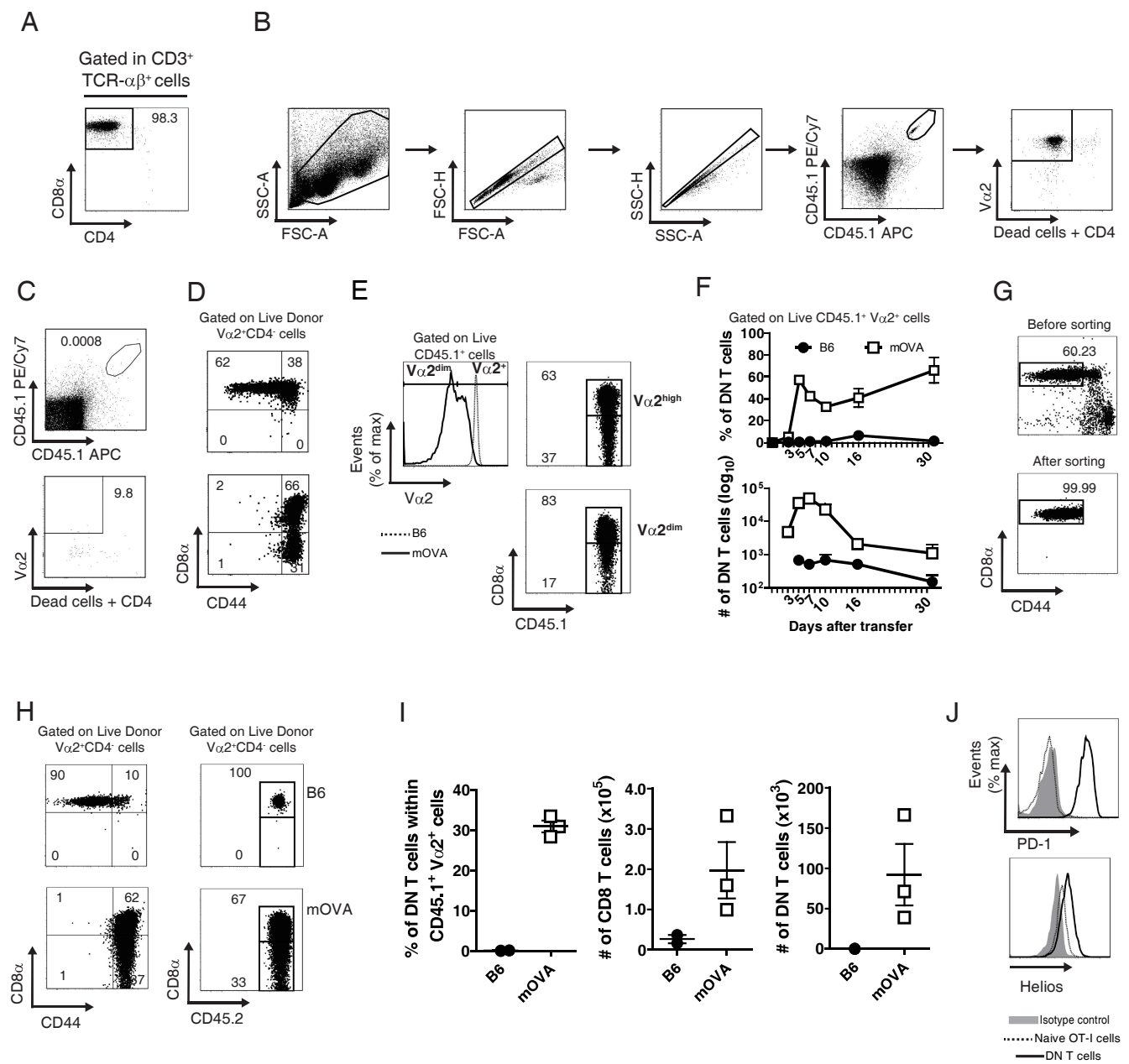


Figure S2. DN T cells appear after transfer of OT-I CD8 cells sorted from Rag1^{-/-} mice. (A) Post-isolation purity of CD8 OT-I cells. (B) Gating strategy used to track OT-I T cells after their transfer into B6.mOVA hosts. (C) Live V α 2⁺ CD45.1⁺ cells are absent in mice that received only PBS. (D) Upregulation of CD44 in CD8 OT-I cells transferred into mOVA mice 10 days after transfer. (E) Expression of TCR V α 2 in OT-I CD8 T cells 10 days after transfer into B6 or mOVA mice (left). CD8 levels in TCR^{hi} and TCR^{dim} cells (right). (F) Time course experiment showing percentages and absolute numbers of DN T cells after transfer of OT-I CD8 cells into B6 and mOVA mice. (G) Post-sorting purity of Rag-1^{-/-} OT-I naïve CD8 T cells. (H) Upregulation of CD44 and expression of CD8 in OT-I cells 10 days after transfer of Rag-1^{-/-} OT-I naïve CD8 T cells into mOVA mice. (I) Cumulative data of (H) expressed as percentage and absolute numbers. (J) Expression of PD-1 and Helios in cells from (H). Data are representative of one, two or three independent experiments with $n \geq 3$.

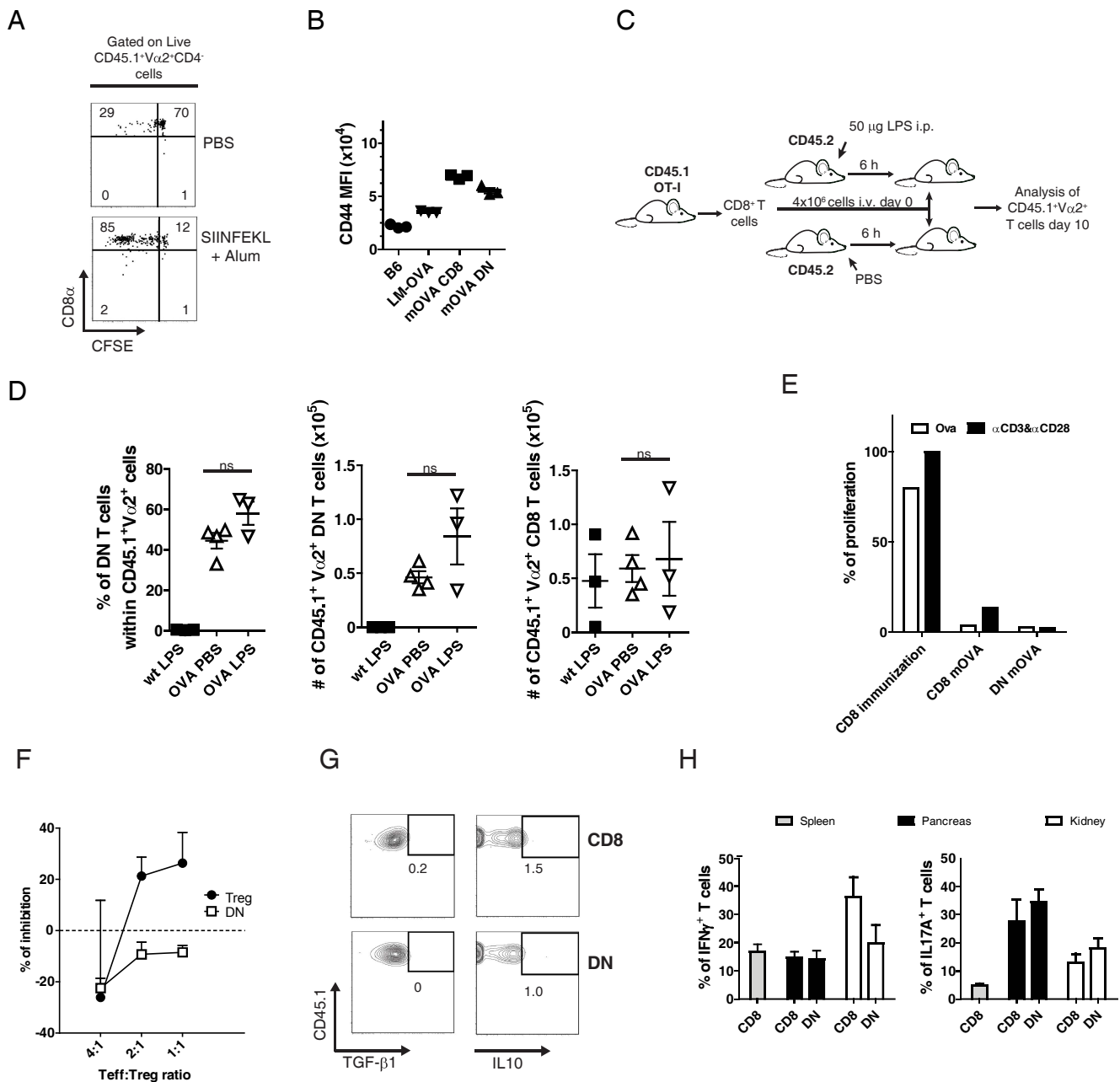


Figure S3. Presentation of cognate antigen as self dictates conversion into unresponsive DN cells with no regulatory function. (A) OT-I CD8 T cells were transferred into B6 mice. One day later, mice were immunized with OVA in alum. Cells were harvested at Day 10 and analyzed for CD8 expression. (B) MFI of CD44 of CD8 and DN OT-I T cells recovered from B6 mice, B6 mice infected with LM-OVA, or mOVA mice. (C) LPS was injected i.p. into B6 or mOVA mice, 6 hours prior to the adoptive transfer of CD8 OT-I cells. (D) CD8 and DN cell numbers and percentages were analyzed in mice from (C) 10 days after transfer. (E) Proliferation of recovered CD8 and DN cells upon rechallenge with OVA or anti-CD3 and anti-CD28. (F) In vitro suppression assay using CD4 OT-II cells as effector cells and OT-I DN T cells or CD4 FoxP3⁺ T cells as suppressor cells. Results are expressed as percentage of inhibition of CD4 OT-II cells stimulated in the absence of suppressor cells. (G) TGF- β 1 and IL-10 production by CD8 and DN T cells recovered from mOVA mice 10 days after transfer of CD8 OT-I cells. (H) Cytokine production in OT-I cells recovered from spleen, pancreas, and kidneys of RIP-mOVA mice 10 days after the transfer of OT-I CD8 T cells. Data are representative of 1-2 independent experiments with $n = 3$.

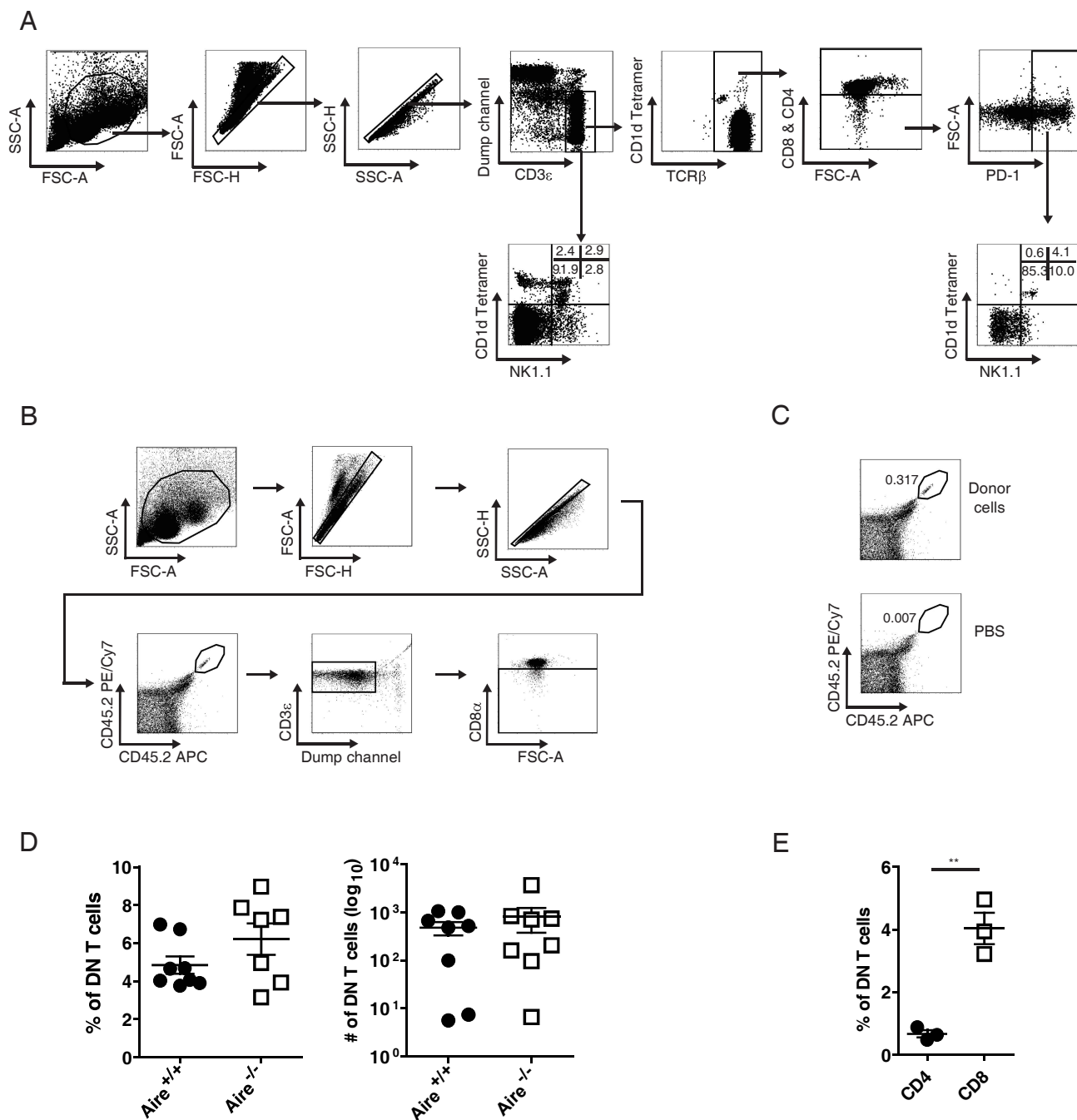


Figure S4. PD-1⁺ DN T cells are present in B6 mice, do not include NKT cells, and can derive from a polyclonal repertoire of CD8 T cells. (A) Gating strategy used to define naturally occurring PD-1⁺ DN T cells in B6 mice and representative dot plots showing binding of CD1d tetramers and NK1.1 expression. Dump channel includes dead cells (Sytox orange⁺), TCR-γδ⁺ and B220⁺ cells. (B) Gating strategy used to identify transferred CD45.2⁺ cells from Aire-sufficient and -deficient donors into B6.CD45.1 mice. Dump channel includes dead cells (Sytox orange⁺), NK1.1⁺, TCR-γδ⁺, CD4⁺, and CD49b⁺ cells. (C) Control gate showing that transferred cells are not present in mice that received PBS. (D) Cumulative data showing percentages and numbers of DN T cells recovered 20 days after transfer. (E) Comparison of DN T cells generated by the transfer of CD4 and CD8 Aire-deficient cells into B6 mice. Data are representative of two or three independent experiments with $n \geq 3$. ** $P < 0.01$.

Capítulo 2

Pro-inflammatory self-reactive T cells are found within murine TCR- $\alpha\beta$ (+) CD4(-) CD8(-) PD-1(+) cells.

Noé Rodríguez-Rodríguez, Sokratis A. Apostolidis, Lauren Fitzgerald, Bronwyn S. Meehan, Alexandra J Corbett, José Manuel Martín-Villa, James McCluskey, George C. Tsokos & José C. Crispín.

***European Journal of Immunology*, 46(6): 1383-91. 2016**

Copyright © 1999-2017 John Wiley & Sons, Inc.

Pro-inflammatory self-reactive T cells are found within murine TCR- $\alpha\beta^+$ CD4 $^-$ CD8 $^-$ PD-1 $^+$ cells

Noé Rodríguez-Rodríguez^{1,2,3}, Sokratis A. Apostolidis¹,
Lauren Fitzgerald¹, Bronwyn S. Meehan⁴, Alexandra J. Corbett⁴,
José Manuel Martín-Villa², James McCluskey⁴, George C. Tsokos¹
and José C. Crispín^{1,3}

¹ Department of Medicine, Beth Israel Deaconess Medical Center, Harvard Medical School, Boston, MA, USA

² Departamento de Inmunología, Facultad de Medicina, Universidad Complutense de Madrid, Madrid, Spain

³ Departamento de Inmunología y Reumatología, Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán, Mexico City, Mexico

⁴ The Department of Microbiology and Immunology, The University of Melbourne and The Peter Doherty Institute for Infection and Immunity, Melbourne, Australia

TCR- $\alpha\beta^+$ double negative (DN) T cells (CD3 $^+$ TCR- $\alpha\beta^+$ CD4 $^-$ CD8 $^-$ NK1.1 $^-$ CD49b $^-$) represent a minor heterogeneous population in healthy humans and mice. These cells have been ascribed pro-inflammatory and regulatory capacities and are known to expand during the course of several autoimmune diseases. Importantly, previous studies have shown that self-reactive CD8 $^+$ T cells become DN after activation by self-antigens, suggesting that self-reactive T cells may exist within the DN T-cell population. Here, we demonstrate that programmed cell death 1 (PD-1) expression in unmanipulated mice identifies a subset of DN T cells with expression of activation-associated markers and a phenotype that strongly suggests they are derived from self-reactive CD8 $^+$ cells. We also found that, within DN T cells, the PD-1 $^+$ subset generates the majority of pro-inflammatory cytokines. Finally, using a TCR-activation reporter mouse (Nur77-GFP), we confirmed that in the steady-state PD-1 $^+$ DN T cells engage endogenous antigens in healthy mice. In conclusion, we provide evidence that indicates that the PD-1 $^+$ fraction of DN T cells represents self-reactive cells.

Keywords: Autoimmunity · DN T cells · IL-17 · Nur77-GFP mice · PD-1



Additional supporting information may be found in the online version of this article at the publisher's web-site

Introduction

Central tolerance acts a major protective force against autoimmunity by eliminating the bulk of autoreactive T cells [1]. However, self-reactive lymphocytes are present in healthy mice and humans

[2–5]. In healthy individuals these cells display an unresponsive phenotype [4, 5], and their abundance is considered low. However, recent reports have proposed that self-reactive T cells may be as frequent as naïve T cells specific for foreign antigens [5]. The presence of self-reactive T cells entails the risk of autoimmunity through the instigation of inflammatory tissue damage and promotion of autoantibody production [6]. Abundance of self-reactive T cells may have prognostic meaning in autoimmunity because their increased frequency has been associated to

Correspondence: Dr. José C. Crispín
e-mail: carlos.crispina@incmnz.mx

autoimmune diseases such as vitiligo, diabetes, and multiple sclerosis [4, 7, 8].

TCR- $\alpha\beta^+$ CD4 $^-$ CD8 $^-$ double negative T cells (henceforth DN T cells) have been associated with autoimmune conditions and display a pro-inflammatory profile. Their frequency is increased in several autoimmune/inflammatory disorders such as systemic lupus erythematosus (SLE) [9], autoimmune lymphoproliferative syndrome [10], and Sjögren's syndrome [11]. They promote autoantibody production [12], are found infiltrating target organs in mice and humans [9, 13], are associated with inflammation and disease progression in mouse models of autoimmunity, and produce several pro-inflammatory cytokines [9, 14]. However, DN T cells represent a scarce population in normal mice and humans, and their study has proved challenging due to the existence of other T cell subsets with a similar phenotype, such as NKT and mucosal-associated invariant T (MAIT) cells. DN T cells have also been ascribed regulatory properties [15], an observation inconsistent with the pro-inflammatory profile reported in patients and mice with inflammatory diseases.

Previous studies have suggested that under certain conditions, CD8 $^+$ T cells may lose CD8 expression and become DN [16–18]. Moreover, we have previously shown that self-reactive CD8 $^+$ T cells lose CD8 expression after recognition of cognate self-antigen and become DN T cells, supporting the concept that CD8 downregulation may represent an active mechanism of peripheral tolerance [19]. Here, we analyze DN T cells in normal, unmanipulated mice and show that programmed cell death 1 (PD-1) expression identifies a subset of DN T cells that displays activation markers, produces pro-inflammatory cytokines, and, importantly, exhibits evidence of TCR-mediated activation. Together, our data indicate that PD-1 $^+$ DN T cells represent self-reactive cells.

Results

PD-1 expression is a feature of a distinct DN T-cell subset in mice

Self-reactive CD8 $^+$ T cells become inactivated upon exposure to cognate self-antigen. During this process, they downregulate CD8 and upregulate inhibitory molecules including PD-1 and Helios [19]. As a result, a population of PD-1 $^+$ DN T cells is generated. These cells are functionally impaired but survive for at least 60 days in adoptive transfer recipients [19]. This suggests that self-reactive former CD8 $^+$ cells may be found within the DN T-cell compartment of normal mice. To address this hypothesis, we analyzed the expression of PD-1 in splenic DN T cells of unmanipulated B6 mice. DN T cells were defined as live CD3 $^+$ TCR- β^+ CD4 $^-$ CD8 $^-$ NK1.1 $^-$ B220 $^-$ CD49b $^-$ cells to exclude TCR- $\gamma\delta$ (TCR- β^-) and NKT (NK1.1 $^+$ CD49b $^+$) cells (Fig. 1A).

Roughly 30% of splenic DN T cells expressed high levels of PD-1 (Fig. 1B). Interestingly, this population accounted for only 10–15% in lymph nodes (LNs) (Fig. 1B and C). Accordingly, DN

T cells produced 30–40 times more PD-1 (*Pdcd1*) mRNA than CD8 $^+$ and four to seven times more than CD4 $^+$ T cells (Fig. 1D).

MAIT cells are rare in spleens of unmanipulated WT mice [20, 21]. However, they may be confounded with DN T cells because their surface marker expression is similar. To determine whether MAIT cells were an important fraction of the PD-1 $^+$ DN population, we measured the frequency of MR1-tetramer $^+$ (Tet $^+$) cells within this subset [20–22]. Only a minute percentage of DN T cells bound MR1-tetramers and we were unable to detect mRNA corresponding to the V α 19-J α 33 TCR rearrangement in PD-1 $^+$ DN T cells (Supporting Information Fig. 1A). In agreement with these results, expression of IL-18R α , found in most MAIT cells [21], was restricted almost exclusively to PD-1 $^-$ DN T cells (Supporting Information Fig. 1B).

PD-1 $^+$ DN cells were not decreased in *Cd1d* $^{-/-}$ mice, and within DN T cells from WT mice virtually none of the cells were positive for CD1d-Tet, further confirming the absence of NKT cells in the PD-1 $^+$ DN subpopulation. These findings were consistent with very low levels of V α 14-J α 18 rearrangement found in PD-1 $^+$ DN cells compared to PD-1 $^-$ DN cells (Supporting Information Fig. 1C and D) [23].

In addition to PD-1, DN T cells derived from self-reactive CD8 $^+$ T cells express Helios [19], a transcription factor upregulated in self-reactive T cells undergoing tolerance [24] and in T cells chronically exposed to cognate antigen [25]. We analyzed the expression of Helios and observed that in contrast to CD4 $^+$ and CD8 $^+$ T cells, the majority of DN cells were positive (Fig. 1E). Approximately, 10% of CD4 $^+$ cells, probably corresponding to Treg cells, also expressed high levels of Helios [26]. Other tolerance-associated surface molecules (CTLA-4, LAG-3, BTLA, and TIM-3) were not expressed by DN T cells (Supporting information Fig. 1E). Of note, a fraction of PD-1 $^+$ DN T cells expressed 2B4 (CD244, *Slamf4*), an inhibitory receptor found in memory CD8 $^+$ T cells and NKT cells [27]. CD160 expression was present in a subset of PD-1 $^-$ DN cells (Supporting information Fig. 1E). Altogether, these results indicate that normal mice have a population of DN T cells, that does not contain MAIT or NKT cells, distinguished by the expression of PD-1 and Helios.

PD-1 $^+$ DN T cells have an effector phenotype

A more thorough analysis was performed to determine whether PD-1 $^+$ DN T cells exhibit evidence of cognate antigen encounter. Because these experiments were performed in unmanipulated mice kept in pathogen-free conditions, presumably only antigens derived from commensal microorganisms and self were exposed to the immune system. Analysis of CD44 and CD62L expression revealed that contrary to CD8 $^+$ and CD4 $^+$, comprised mostly of naïve CD62L $^+$ CD44 low cells, the DN compartment (PD-1 $^-$ and PD-1 $^+$) was enriched with cells bearing an activated or effector memory/central memory phenotype (CD62L $^-$ CD44 $^+$ /CD62L $^+$ CD44 $^+$, respectively; Supporting Information Fig. 2A). Interestingly, the majority of PD-1 $^+$ DN T cells lacked expression of CD62L.

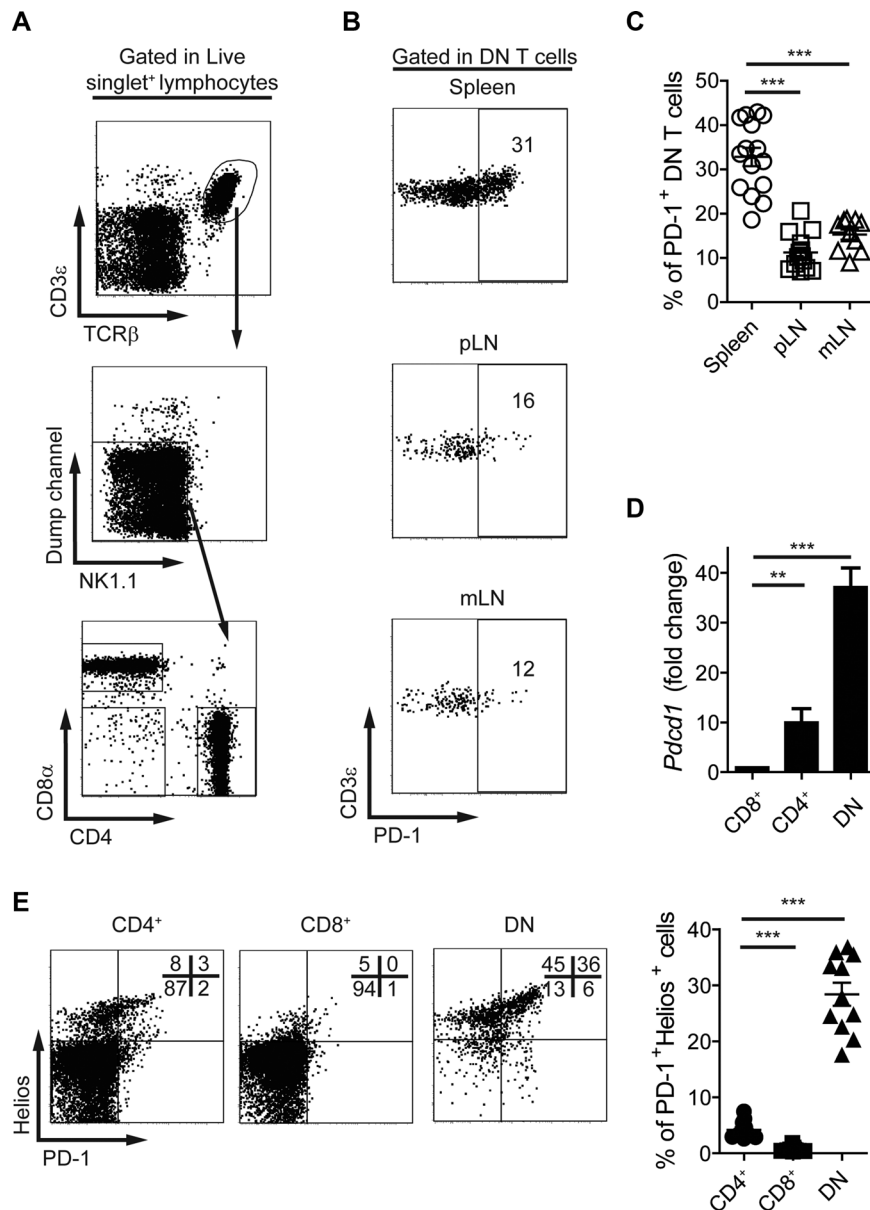


Figure 1. PD-1 expression is a feature of a distinct DN T-cell subset in C57BL/6 mice. (A) Gating strategy for DN T cells, CD4⁺, and CD8⁺ T cells. Dump channel includes: B220⁺, TCR- $\gamma\delta$ ⁺, and CD49b⁺ cells. (B) Representative dot plots and (C) percentages of PD-1⁺ DN cells in the spleen, axillary and inguinal LN (pLN), and mLN (A and B, representative dot plots from five experiments; C, cumulative data pooled from five experiments with $n = 2$ –5 mice/experiment). (D) *Pdc1* mRNA levels in CD4⁺, CD8⁺, or DN TCR- $\alpha\beta$ ⁺ cells. Results are expressed as fold change over CD8⁺ T cells. Data are pooled from three independent experiments ($n = 10$ –20 mice/experiment). (E) Distribution of splenic CD4⁺, CD8⁺, or DN T cells according to the expression of PD-1 and Helios (dot plots are representative of and cumulative data are pooled from four experiments, $n = 2$ –3 mice/experiment). Cumulative data are shown as mean \pm SEM. One way ANOVA was used followed by Bonferroni's test. ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

The distribution of other activation markers was heterogeneous between PD-1[−] and PD-1⁺ DN T cells. PD-1⁺ cells did not express early activation markers such as CD69 or CD25 but had increased levels of CD43, CD122 (IL-2R β), and CD11a (LFA-1 α) (Fig. 2A). CD127 (IL-7R α), downregulated upon acquisition of effector phenotype, was decreased only in PD-1⁺ DN T cells (Fig. 2B). Expression of CD27 was not different between PD-1⁺ and PD-1[−] DN T cells. Ly-6C is expressed at high levels by CD8⁺ memory cells but downregulated in cells with high reactivity toward self-peptide/MHC and in chronically activated T cells [25, 28, 29]. Whereas PD-1[−] DN cells expressed high amounts of Ly-6C, their PD-1⁺ counterparts expressed low levels suggesting chronic exposure to cognate antigen (Fig. 2C).

In order to compare the phenotype of naturally occurring DN PD-1⁺ T cells with that of DN T cells generated by exposure to self-antigen, we adoptively transferred CD8⁺ OT-I CD45.1⁺ T cells into mOVA mice that ubiquitously express OVA [19] and analyzed their phenotype at days 3, 10, and 30 after transfer (Supporting Information Fig. 2B). In this model, a large fraction of CD8⁺ T cells loses CD8 expression by day 10 [19]. As shown in Figure 2D, at day 3, prior to CD8 downregulation, cells transferred into mOVA mice upregulated CD11a, CD43, CD122, PD-1, and Helios. Additionally, the expression of Ly-6C was suppressed. These changes are indicative of antigen exposure. By days 10 and 30, DN T cells derived from transferred OT-I cells maintained high expression of CD11a, CD43, CD122, and PD-1 as well as low levels of Ly-6C.

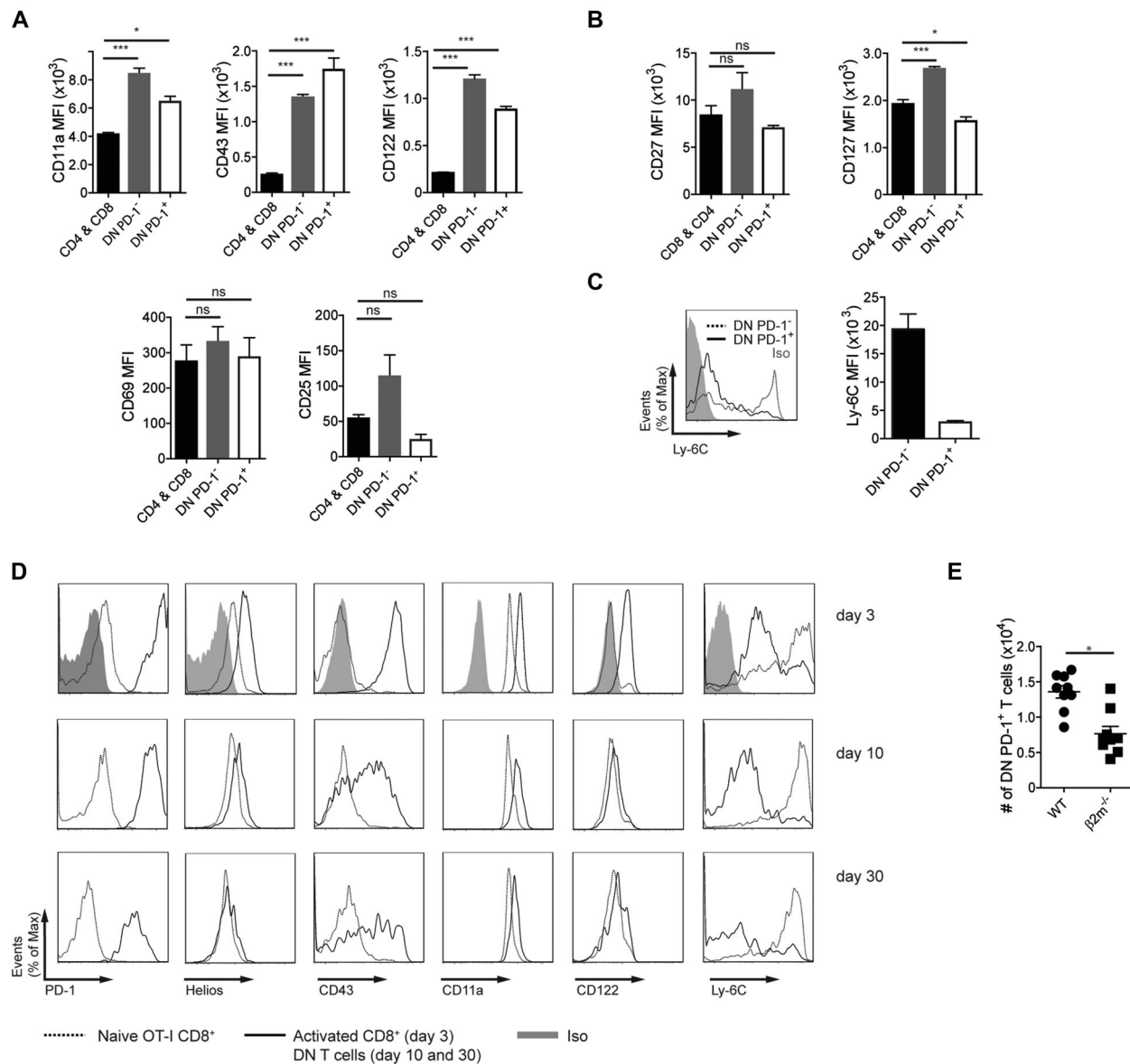


Figure 2. PD-1⁺ DN T cells display features of activated T cells and resemble DN cells derived from self-reactive CD8⁺ T cells. (A) Flow cytometry was used to measure the expression of the activation-induced surface markers CD11a, CD43, CD122, CD69, and CD25; and, (B) CD27 and CD127 of CD4⁺ and CD8⁺ (CD4 and CD8), PD-1⁻, and PD-1⁺ DN T cells from spleens of C57BL/6 mice. Results are expressed as average mean fluorescence intensity (MFI) ± SEM (cumulative data are pooled from two to three experiments; *n* = 2–5 mice/experiment). (C) Ly-6C expression in PD-1⁻ and PD-1⁺ DN cells. Histogram is representative of and cumulative data are combined from two experiments with three to five animals per experiment. (D) Phenotype of transferred CD8⁺/DN T cells exposed to cognate self-antigen (mOVA mice) harvested from spleens of recipient mice at 3, 10, or 30 days after transfer. CD45.1⁺ congenic OT-I CD8⁺ T cells were i.v. adoptively transferred into WT (naïve OT-I CD8⁺) or mOVA (activated CD8⁺ and DN T cells). Histograms are representative of one to two experiments with 3 animals/group/experiment. (E) Absolute number of PD-1⁺ DN T cells from spleens of WT and β2m^{-/-} mice (cumulative data are pooled from three experiments, *n* = 3 mice/group/experiment). Cumulative data are expressed as mean ± SEM. One way ANOVA with Bonferroni's test (A–C) and unpaired *t* test (E) were used. **p* < 0.05; ****p* < 0.001.

Helios gradually returned to baseline suggesting that its expression at high levels indicates recent antigen-driven activation (Fig. 2D).

Because PD-1⁺ DN T cells found in normal mice may represent previous self-reactive CD8⁺ T cells, we analyzed whether MHC class I is necessary for their presence. We observed that the numbers of PD-1⁺ DN T cells decreased by half in MHC class I-deficient mice (β2m^{-/-}) (Fig. 2E). Moreover, cluster analysis of the TCR Vβ repertoire indicated a similar Vβ usage between CD8⁺ and DN T cells (Supporting Information Fig. 2C).

PD-1⁺ cells represent the main source of pro-inflammatory cytokines produced by DN T cells

DN T cells have been reported to be a relevant source of IL-17 and other pro-inflammatory cytokines in the context of autoimmunity and infection [9, 14, 30]. To determine their cytokine production capacity in the steady state, we analyzed cytokine production in freshly isolated DN T cells stimulated for 6 h with PMA and ionomycin. As shown in Figure 3A, a relatively high fraction of

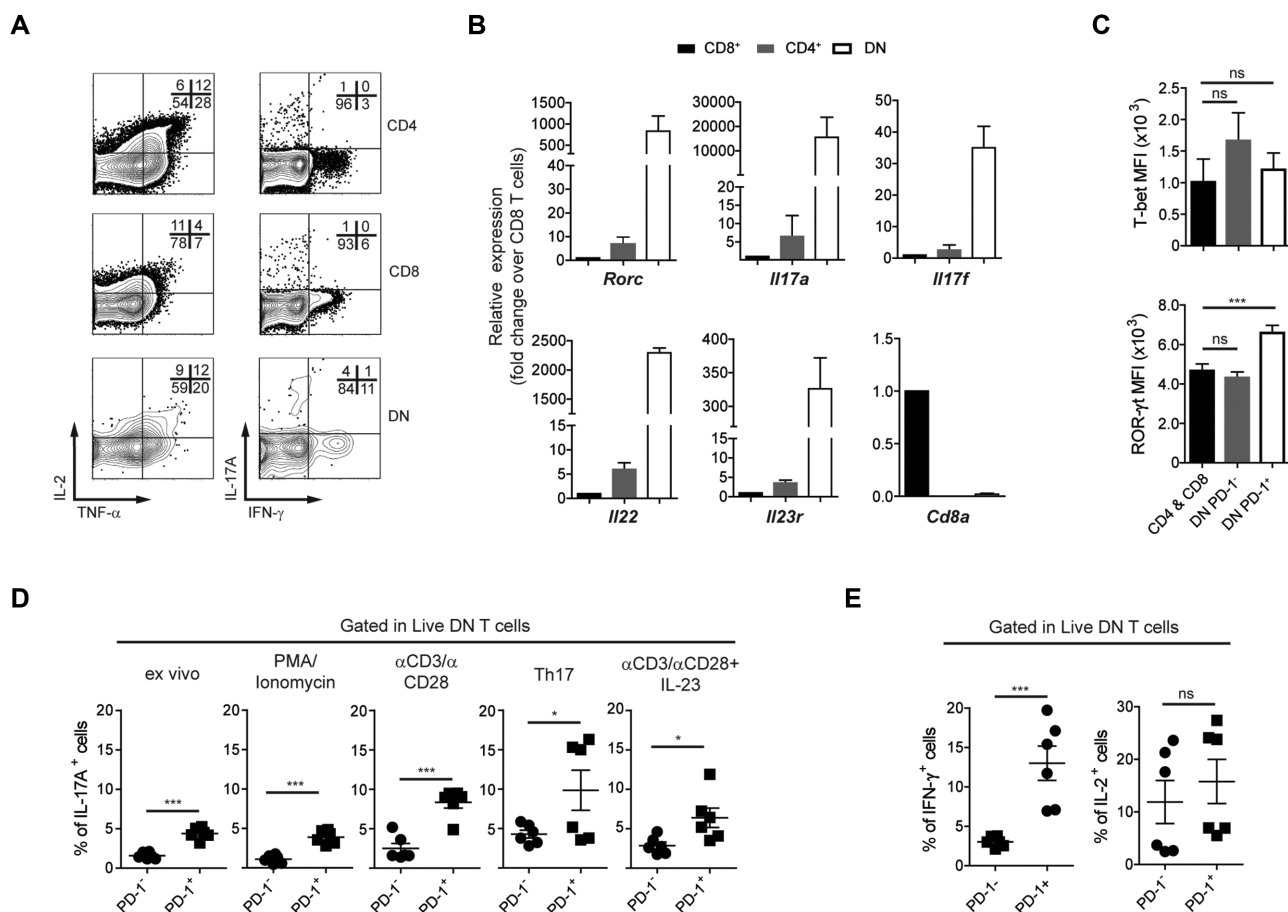


Figure 3. PD-1⁺ DN T cells are the major cytokine producers within the DN TCR-αβ⁺ subset. (A) IL-2, TNF-α, IFN-γ, and IL-17A production from CD4⁺, CD8⁺, and DN splenic T cells (Representative contour plots from two to four independent experiments, *n* = 3 mice/experiment). (B) mRNA of Th17 signature genes (*Rorc*, *Il17a*, *Il17f*, *Il22*, and *Il23r*) from ex vivo FACS-sorted CD4⁺, CD8⁺, and DN T cells. *Cd8a* expression is shown as control (pooled cumulative data from two experiments obtained as in Fig. 1D combining spleen- and pLN-harvested cells from 15–25 mice/experiment). (C) Expression of T-bet and ROR-γt in CD4⁺ and CD8⁺, PD-1⁻, and PD-1⁺ DN T cells from spleens of C57BL/6 mice. (D and E) Percentage of cytokine⁺ (IL-17A, IFN-γ, and IL-2) splenocytes within PD-1⁻ and PD-1⁺ DN cells was measured by flow cytometry. (D) IL-17 production measured as GFP abundance in IL-17A-GFP reporter mice directly ex vivo, after PMA/Ionomycin, αCD3/αCD28, Th17 differentiation conditions (Th17), or in the presence of IL-23. (E) IFN-γ and IL-2 production quantified by intracellular cytokine staining after PMA/Ionomycin. Cumulative data in C–E are pooled from two experiments; *n* = 3 mice/experiment. Data are expressed as mean ± SEM. Unpaired *t* test (D and E) and one way ANOVA with Bonferroni's test (C) were applied; ns: not significant; **p* < 0.05; ****p* < 0.001.

DN cells produced IL-2, IFN-γ, TNF-α, and IL-17A. Further, FACS-sorted DN T cells were enriched in Th17-related transcripts (*Il23r*, *Il17a*, *Il17f*, *Il22*, *Rorc*) in the absence of any ex vivo stimulation (Fig. 3B).

To investigate whether the pro-inflammatory capacity of DN T cells was asymmetrically divided between PD-1⁻ and PD-1⁺ cells, we evaluated RAR-related orphan receptor (ROR) γt and T-bet, as well as cytokine production in both DN cell subsets. As shown in Figure 3C, ROR-γt expression (quantified as mean fluorescence intensity (MFI)) was significantly higher in PD-1⁺ DN cells than in CD4⁺ and CD8⁺, and in PD-1⁻ DN T cells. Accordingly, PD-1⁺ DN T cells from an *Il17a*-GFP reporter mouse produced more IL-17A than PD-1⁻ counterparts when measured ex vivo, as well as after stimulation with PMA/ionomycin (6 h), or anti-CD3/CD28 in the presence or absence of IL-23 or other Th17-promoting cytokines (Fig. 3D) [30]. Production of IFN-γ was also significantly higher in PD-1⁺ DN T cells (Fig. 3E).

PD-1⁺ DN cells are exposed to endogenous cognate antigen

The phenotype of PD-1⁺ DN T cells strongly suggested that these cells have been exposed to cognate antigen, probably of self-origin. In order to confirm this and rule out other explanations to their effector phenotype (i.e. bystander activation in response to cytokines or other pro-inflammatory cues), we analyzed in vivo TCR signaling using Nur77-GFP reporter mice. In this system, previously used to detect self-reactive lymphocytes [31–33], GFP expression is upregulated in lymphocytes whose antigen receptor (TCR or BCR) has been engaged and the abundance of GFP can be used as a surrogate marker of signaling strength [34].

First, we confirmed that GFP expression in DN T cells behaved like that of CD4 and CD8 (i.e. it increased upon TCR activation and decreased when T cells were deprived of MHC signals; Supporting Information Fig. 2D). In order to determine whether DN T cells

had been exposed to cognate antigen, we analyzed their GFP content directly ex vivo. As shown in Figure 4A, GFP expression in DN T cells mostly paralleled PD-1 expression, where PD-1⁺ cells were GFP⁺ and vice versa. No equivalent population was observed in CD4⁺ and CD8⁺ T cells. A comparison of the GFP levels between PD-1[−] and PD-1⁺ DN T cells confirmed that PD-1⁺ cells had significantly more GFP and its abundance was even higher than in other cells known to encounter self-antigens (e.g. Treg cells or tNKT cells; Fig. 4B and C) [34]. Of note, GFP expression was higher in Helios^{high} DN T cells than in Helios^{int} DN T cells (Fig. 4D). These results demonstrate that PD-1⁺ DN T cells have received a signal through the TCR. The high levels of GFP expression suggest that the signal was strong and recent. In line with the idea that PD-1⁺ DN T cells are self-reactive, we found that the frequency of these cells was significantly increased in mice that accumulate autoreactive T cells as a consequence of defects in central and peripheral tolerance (*Aire*^{−/−} and *Fas*^{lpr} mice, respectively; Fig. 4E and F) [1, 35].

Besides self-antigens, APCs from unmanipulated WT mice housed in specific pathogen-free (SPF) facilities can cross-present microbiota-derived molecules. To exclude the possibility that PD-1⁺ DN T cells were being primed by microbiome-derived antigens, we analyzed the frequency and phenotype of PD-1⁺ DN T cells in germ-free (GF) mice. We did not observe a reduction in the proportion or numbers of PD-1⁺ DN T cells in GF mice (Fig. 4G). Accordingly, expression of activation markers (CD11a, Ly-6C, CD44) did not change significantly in cells derived from GF mice, when compared to cells from mice housed in SPF conditions

(Supporting Information Fig. 2E). These findings argue against DN T cells being activated by foreign antigen in normal unmanipulated C57BL/6 mice. If DN T cells were microbiota-dependent, their population would experience a reduction as observed in MAIT [36] and NKT cells [37] (Supporting Information Fig. 2F).

Discussion

Here, we have shown that the presence of PD-1 distinguishes a subset of DN T cells in normal mice. The evidence provided argues that PD-1⁺ DN cells have acquired an effector phenotype (activation markers, cytokine production, expression of *Rorc*) most probably induced by cognate antigen exposure. The remarkable phenotypic similarities between these cells identified in unmanipulated mice and those generated by exposing CD8⁺ T cells to known cognate antigen presented as self, suggest that PD-1⁺ DN T cells (PD-1⁺Helios⁺Ly-6C[−]) may represent self-reactive former CD8⁺ T cells that have undergone an inactivation process in the periphery.

Our data indicate that PD-1⁺ DN T cells represent a separate population, different from other unconventional or scarce T-cell subsets such as MAIT or NKT cells. The presence of both of these cell types in the PD-1⁺ DN T cell fraction was ruled out by tetramer staining, measurement of invariant TCR-specific mRNA, and by analyses of their phenotype (i.e. CD127, CD69, CD49b, NK1.1, IL-18R α). Moreover, contrary to what occurs to MAIT and NKT cells, the PD-1⁺ DN T-cell population was unaffected by GF conditions. Mice deficient in class I molecules ($\beta 2m^{-/-}$) exhibit a significant

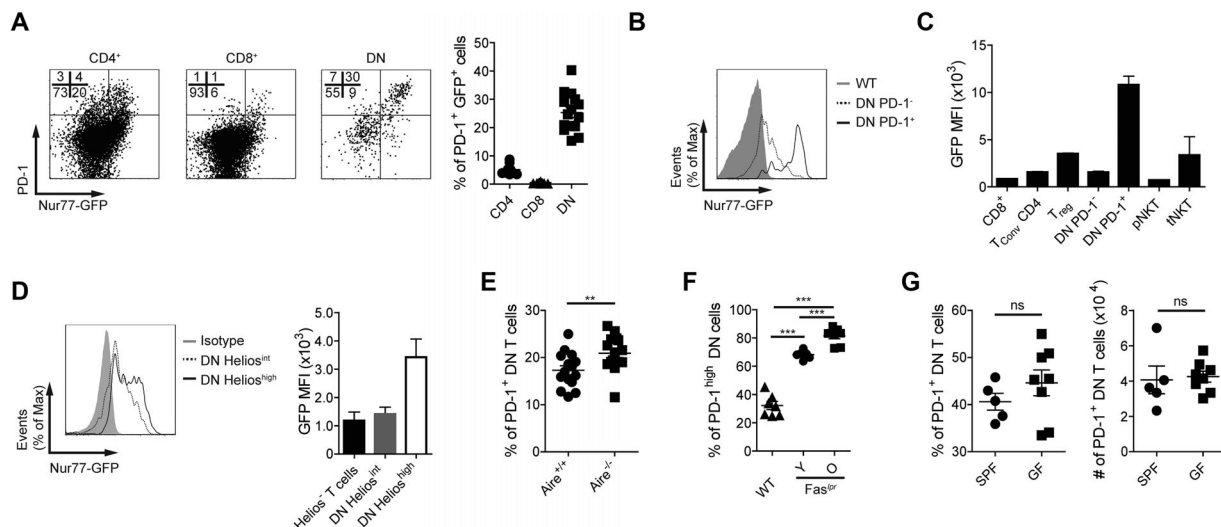


Figure 4. PD-1⁺ DN T cells encountered endogenous antigen. (A) Representative dot plots (left) and percentages (right) of CD4⁺, CD8⁺, and DN T cells from spleens of Nur77-GFP reporter mice as gated in Fig. 1A were analyzed for the expression of PD-1 and GFP (cumulative data are pooled from four experiments; $n = 3$ –5 mice/experiment). (B) Representative histogram of DN PD-1[−] and DN PD-1⁺ cells (from A) and (C) cumulative data of GFP levels in several T-cell populations from spleen (CD8⁺, T_{conv}CD4, Treg cells, DN PD-1[−], DN PD-1⁺, pNKT) and thymus (tNKT) of Nur77-GFP mice. T_{conv}CD4: CD4⁺CD25[−] T cells; Treg cells: CD4⁺CD25⁺ T cells; pNKT: NK1.1⁺ T cells; tNKT: CD1d/αGalCer-Tetramer⁺CD44^{low} NK1.1^{low}CD24⁺ (cumulative data from one experiment representative of two; $n = 3$ mice/experiment). (D) Representative histogram (left) and cumulative data (right) of GFP levels in DN T cells in relation to their expression of Helios (cumulative data are pooled from two experiments; $n = 3$ mice/experiment). (E) Percentages of PD-1⁺ DN T spleen cells in WT and *Aire*^{−/−} littermate mice (data from five experiments, $n = 1$ –4 mice/group/experiment). (F) Percentages of PD-1⁺ DN T cells in spleens of WT, and young (Y: 5- to 6-week-old) and old (O: 20- to 27-week-old) C57BL/6.*Fas*^{lpr} mice (data from two experiments; 2–6 mice/experiment). (G) Frequencies (left) and total numbers (right) of PD-1⁺ DN T cells in spleens of SPF and GF sex- and age-matched mice (one experiment, $n = 5$ –8). Data are expressed as mean \pm SEM. Unpaired t test (E and G) and one-way ANOVA (F) were used; ns: not significant; * $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

decrease in the number of PD-1⁺ DN T cells. The fact that they are not completely absent in $\beta 2m^{-/-}$ mice may be related to the gross alterations in thymic ontogeny and T-cell repertoire that characterize MHC deficient mice [38–41], or alternatively could result from the presence of other unrecognized DN T cells not restricted to class I MHC.

Determining the self-reactive nature of PD-1⁺ DN T cells represents a challenge because no specific technology has been developed for this purpose. No group of cognate antigens is known to be specific for PD-1⁺ DN T cells. In addition, the use of tetramers developed for CD8⁺ cells may not bind to DN T cells due to the lack of the coreceptor [5, 42]. For this reason, we approached the problem in a comprehensive manner. Based on the following data, we propose that PD-1⁺ DN T cells are self-reactive: (i) they express high levels of Helios and PD-1; (ii) their phenotype is very similar to the one of CD8⁺ T cells that have encountered antigen as self; (iii) they express high levels of activation markers in the steady state; (iv) they lack Ly-6C and CD127; (v) absence of microbiota does not affect their levels or phenotype; (vi) they show evidence of TCR-mediated activation (high GFP levels in the Nur77-GFP reporter background).

PD-1⁺ DN T cells display high levels of activation-induced molecules (i.e. CD11a, CD43, CD44) and low levels of surface receptors downregulated upon TCR engagement (i.e. CD62L and CD127). Interestingly, the low levels of CD62L may explain their relative high concentration in the spleen, the only secondary lymphoid organ where homing does not involve CD62L [43]. Helios is upregulated upon TCR activation [44] and its levels remain high when antigen is chronically present and displayed [25]. Because we cannot dismiss that other unknown signals may regulate the expression of these molecules, we analyzed a mouse model that has been shown to specifically report (by GFP expression) TCR activity not influenced by other environmental cues [34]. We found that, similar to known self-reactive T (Treg) cells, PD-1⁺ DN T cells have elevated GFP levels. This provided us with strong evidence supporting the autoreactive nature of PD-1⁺ DN T cells.

PD-1⁺ DN T cells are actively exposed to TCR signaling and transcribe Th17-related genes. Further, a relatively large fraction of them produces pro-inflammatory cytokines. These features (i.e. their autoreactivity and their pro-inflammatory capacity) indicate that they possess pathogenic potential. DN T cells are expanded in some systemic autoimmune diseases such as SLE and Sjögren's syndrome and they have been proposed by our group and others to play a role in these conditions [9, 11, 13, 18]. Their presence in healthy mice and humans is not associated to any pathology, which indicates that in normal conditions their pathogenic potential is neutralized. This may be related to their low frequency [45] and/or to the presence of mechanisms that limit their activation. CD8 downregulation, as well as their high expression of molecules with inhibitory ability (i.e. PD-1 and Helios), may limit their expansion and pathogenicity. Why these cells expand in the setting of autoimmunity may be related to defects in the expression or function of the inhibitory molecules that keep them in check in normal individuals. A recent report suggested that SLE disease activity and prognosis is influenced by the expression of

inhibitory molecules in CD8⁺ T cells including PD-1 [46]. The question of whether DN T cells are inadequately controlled in systemic autoimmune conditions is the focus of current investigation.

Materials and methods

Mice

Mice 8–14 weeks (unless indicated otherwise) of age were used. C57BL/6, Nur77-GFP, IL-17A-GFP, OT-I, CD45.1, Act-mOVA (mOVA), $\beta 2m^{-/-}$, Fas^{lpr} (all C57BL/6 background) were obtained from Jackson Laboratories (Bar Harbor, ME). *Cd1d*^{-/-} mice were kindly provided by Dr. Lydia Lynch. Aire-deficient (*Aire*^{-/-}) mice were generously provided by Drs. Christophe Benoist, Noriyuki Fujikado, and Matthew Meredith. All mice were housed and bred in a SPF facility at BIDMC following IACUC guidelines. This work was approved by BIDMC IACUC (Protocol #094-2012, Dr. José C. Crispín). GF mice were a generous gift from Drs. Dennis Kasper, Francesca S. Gazzaniga and Isaac Kasper and they were negative for microbiota presence by the day of the experiment.

Flow cytometry

Spleen and LNs were dissociated in full RPMI 1640. Unless otherwise indicated, for surface epitopes, cells were stained in PBS + 2% FCS for 30 min after blocking Fc receptors with TruStain fcX (Biolegend). All antibodies were from Biolegend or eBioscience (for complete antibody list see Supporting information), except anti-IL-18R α (R&D). Samples were acquired in a modified LSRII (BD Biosciences, San Jose, CA) and analyzed with FlowJo (TreeStar, Ashland, OR).

For intracellular staining, cells were stained for surface antigens and further processed with the Cytofix/Cytoperm (BD) or Foxp3/Transcription Factor Staining buffer (eBioscience) kits as per manufacturer's instructions. Cytokines were measured after stimulating the cells with PMA (50 ng/mL) plus Ionomycin (250 ng/mL, Sigma) in the presence of Brefeldin A (BD) for 5–7 h.

For tetramer staining, cells were incubated for 1 h at RT (CD1d-Tet) prior to surface staining or 30 min (MR1-Tet) at RT together with antibody cocktail for surface staining. MR1-Tetramers were synthesized and loaded as previously described [20–22].

Tissue culture and T-cell isolation

For in vitro stimulation, T cells (purified by magnetic selection; Dynabeads) or splenocytes were cultured on flat-bottom 96-well plates in full RPMI with plate-bound anti-CD3/anti-CD28 (2 μ g/mL) at a density of $4\text{--}5 \times 10^5$ cells/well for 16 or 72 h. When indicated, splenocytes were stimulated in the presence of IL-23 (10 ng/mL) or IL-23 plus IL-6 (25 ng/mL) and TGF- β 1 (2.5 ng/mL) for 3 days.

For adoptive transfers, CD8⁺ cells from spleen and LNs of OT-I.CD45.1 mice were magnetically isolated with Dynabeads

(purity $\geq 95\%$). A total of 5×10^6 cells in PBS were injected by tail vein injection into mOVA.CD45.2 or B6 mice.

Real-time PCR

Splenocytes and LN cells from 10 to 25 mice were enriched in T cells by magnetic selection. CD4⁺, CD8⁺, DN T (total, PD-1⁺ or PD-1⁻) cells as defined in Fig. 1A, and enriched MAIT (eMAIT: mLN CD4⁺/DN T cells expressing TCR V β 8.2/8.3 and IL-18R α) or NKT (eNKT: mLN T cells containing 1/3 CD1d-Tetramer⁺ cells) cells were sorted in a FACSria ($\geq 95\%$ purity). Samples were washed and lysed in TRIzol Reagent (Life Technologies). RNA was isolated and cDNA synthesized from 1 μ g RNA with EcoDry Premix (Clontech, CA). Quantitative PCR was performed using FastStart Universal SYBR Master (Roche, IN) in a StepOne Plus RT-PCR System (Applied Biosystems). To measure the relative amount of C α , V α 14-J α 18, and V α 19-J α 33 TCR chains, sorted populations as described above were processed with PureLink RNA Micro Kit (Invitrogen) and cDNA synthesized from 500 ng RNA with the iScriptTM cDNA Synthesis Kit (Bio-Rad). Quantitative PCR was performed as before or using custom TaqMan assay with previously described primers [47].

Statistical analyses

Statistical analysis was performed using Graphpad Prism. Groups were compared using Student's *t*-test, ANOVA (Bonferroni's or Tukey's post-test), or their nonparametric equivalents when required.

Acknowledgments: We acknowledge the NIH Tetramer Core Facility (contract HHSN272201300006C) for provision of CD1d-tetramers. We are grateful to Drs. Christophe Benoist, Lydia Lynch, and Dennis Kasper for providing several strains of mice.

This work was supported by the National Institute of Arthritis and Musculoskeletal and Skin Diseases (R21 AR063262) (J.C.C.) and by the National Institute of Allergy and Infectious Diseases (R01 AI085567) (G.C.T.) of the National Institutes of Health, and by a grant from the Alliance for Lupus Research (J.C.C.). S.A.A. was supported by a Postdoctoral Fellowship Award from the Arthritis Foundation.

Conflict of interest: The authors declare no financial or commercial conflict of interest.

References

- 1 Anderson, M. S., Venanzi, E. S., Chen, Z., Berzins, S. P., Benoist, C. and Mathis, D., The cellular mechanism of Aire control of T cell tolerance. *Immunity* 2005. **23**: 227–239.

- 2 Zehn, D., Lee, S. Y. and Bevan, M. J., Complete but curtailed T-cell response to very low-affinity antigen. *Nature* 2009. **458**: 211–214.
- 3 Enouz, S., Carrié, L., Merkle, D., Bevan, M. J. and Zehn, D., Autoreactive T cells bypass negative selection and respond to self-antigen stimulation during infection. *J. Exp. Med.* 2012. **209**: 1769–1779.
- 4 Maeda, Y., Nishikawa, H., Sugiyama, D., Ha, D., Hamaguchi, M., Saito, T., Nishioka, M. et al., Detection of self-reactive CD8⁺ T cells with an anergic phenotype in healthy individuals. *Science* 2014. **346**: 1536–1540.
- 5 Yu, W., Jiang, N., Ebert, P. J. R., Kidd, B. A., Müller, S., Lund, P. J., Juang, J. et al., Clonal deletion prunes but does not eliminate self-specific $\alpha\beta$ CD8⁺ T lymphocytes. *Immunity* 2015; **42**: 929–941.
- 6 Tsokos, G. C., Systemic lupus erythematosus. *N. Engl. J. Med.* 2011. **365**: 2110–2121.
- 7 Zang, Y. C. Q., Li, S., Rivera, V. M., Hong, J., Robinson, R. R., Breitbach, W. T., Killian, J. et al., Increased CD8⁺ cytotoxic T cell responses to myelin basic protein in multiple sclerosis. *J. Immunol.* 2004. **172**: 5120–5127.
- 8 Arif, S., Tree, T. I., Astill, T. P., Tremble, J. M., Bishop, A. J., Dayan, C. M., Roep, B. O. et al., Autoreactive T cell responses show proinflammatory polarization in diabetes but a regulatory phenotype in health. *J. Clin. Invest.* 2004. **113**: 451–463.
- 9 Crispín, J. C., Oukka, M., Bayliss, G., Cohen, R. A., Van Beek, C. A., Stillman, I. E., Kyttaris, V. C. et al., Expanded double negative T cells in patients with systemic lupus erythematosus produce IL-17 and infiltrate the kidneys. *J. Immunol.* 2008. **181**: 8761–8766.
- 10 Bleesing, J. J., Brown, M. R., Dale, J. K., Straus, S. E., Lenardo, M. J., Puck, J. M., Atkinson, T. P. et al., TcR-alpha/beta(+) CD4(-)CD8(-) T cells in humans with the autoimmune lymphoproliferative syndrome express a novel CD45 isoform that is analogous to murine B220 and represents a marker of altered O-glycan biosynthesis. *Clin. Immunol.* 2001. **100**: 314–324.
- 11 Alunno, A., Bistoni, O., Bartoloni Bocci, E., Caterbi, S., Bigerna, B., Pucciarini, A., Tabarrini, A. et al., IL-17-producing double-negative T cells are expanded in the peripheral blood, infiltrate the salivary gland and are partially resistant to corticosteroid therapy in patients with Sjögren's syndrome. *Reumatismo* 2013. **65**: 192–198.
- 12 Shivakumar, S., Tsokos, G. C. and Datta, S. K., T cell receptor alpha/beta expressing double-negative (CD4-/CD8-) and CD4+ T helper cells in humans augment the production of pathogenic anti-DNA autoantibodies associated with lupus nephritis. *J. Immunol.* 1989. **143**: 103–112.
- 13 Zhang, Z., Kyttaris, V. C. and Tsokos, G. C., The role of IL-23/IL-17 axis in lupus nephritis. *J. Immunol.* 2009. **183**: 3160–3169.
- 14 Sherlock, J. P., Joyce-Shaikh, B., Turner, S. P., Chao, C.-C., Sathe, M., Grein, J., Gorman, D. M. et al., IL-23 induces spondyloarthritis by acting on ROR- γ t+ CD3+CD4-CD8- enthesal resident T cells. *Nat. Med.* 2012. **18**: 1069–1076.
- 15 D'Acquisto, F. and Crompton, T., CD3+CD4-CD8- (double negative) T cells: saviours or villains of the immune response? *Biochem. Pharmacol.* 2011. **82**: 333–340.
- 16 Mehal, W. Z. and Crispe, I. N., TCR ligation on CD8+ T cells creates double-negative cells in vivo. *J. Immunol.* 1998. **161**: 1686–1693.
- 17 Pestano, G. A., Zhou, Y., Trimble, L. A., Daley, J., Weber, G. F. and Cantor, H., Inactivation of misselected CD8 T cells by CD8 gene methylation and cell death. *Science* 1999. **284**: 1187–1191.
- 18 Crispín, J. C. and Tsokos, G. C., Human TCR-alpha beta+ CD4- CD8- T cells can derive from CD8+ T cells and display an inflammatory effector phenotype. *J. Immunol.* 2009. **183**: 4675–4681.
- 19 Rodríguez-Rodríguez, N., Apostolidis, S. A., Penaloza-MacMaster, P., Martín Villa, J. M., Barouch, D. H., Tsokos, G. C. and Crispín, J. C.,

- Programmed cell death 1 and Helios distinguish TCR- $\alpha\beta$ + double-negative (CD4-CD8-) T cells that derive from self-reactive CD8 T cells. *J. Immunol.* 2015. **194**: 4207–4214.
- 20 Reantragoon, R., Corbett, A. J., Sakala, I. G., Gherardin, N. A., Furness, J. B., Chen, Z., Eckle, S. B. G. et al., Antigen-loaded MR1 tetramers define T cell receptor heterogeneity in mucosal-associated invariant T cells. *J. Exp. Med.* 2013. **210**: 2305–2320.
 - 21 Rahimpour, A., Koay, H. F., Enders, A., Clanchy, R., Eckle, S. B. G., Meehan, B., Chen, Z. et al., Identification of phenotypically and functionally heterogeneous mouse mucosal-associated invariant T cells using MR1 tetramers. *J. Exp. Med.* 2015. **212**: 1095–1108.
 - 22 Corbett, A. J., Eckle, S. B. G., Birkinshaw, R. W., Liu, L., Patel, O., Mahony, J., Chen, Z. et al., T-cell activation by transitory neo-antigens derived from distinct microbial pathways. *Nature* 2014. **509**: 361–365.
 - 23 Smiley, S. T., Kaplan, M. H. and Grusby, M. J., Immunoglobulin E production in the absence of interleukin-4-secreting CD1-dependent cells. *Science* 1997. **275**: 977–979.
 - 24 Ross, E. M., Bourges, D., Hogan, T. V., Gleeson, P. A. and van Driel, I. R., Helios defines T cells being driven to tolerance in the periphery and thymus. *Eur. J. Immunol.* 2014. **44**: 2048–2058.
 - 25 Crawford, A., Angelosanto, J. M., Kao, C., Doering, T. A., Odorizzi, P. M., Barnett, B. E. and Wherry, E. J., Molecular and transcriptional basis of CD4⁺ T cell dysfunction during chronic infection. *Immunity* 2014. **40**: 289–302.
 - 26 Thornton, A. M., Korty, P. E., Tran, D. Q., Wohlfert, E. A., Murray, P. E., Belkaid, Y. and Shevach, E. M., Expression of Helios, an Ikaros transcription factor family member, differentiates thymic-derived from peripherally induced Foxp3⁺ T regulatory cells. *J. Immunol.* 2010. **184**: 3433–3441.
 - 27 Waggoner, S. N. and Kumar, V., Evolving role of 2B4/CD244 in T and NK cell responses during virus infection. *Front. Immunol.* 2012. **3**: 377.
 - 28 Casey, K. A., Fraser, K. A., Schenkel, J. M., Moran, A., Abt, M. C., Beura, L. K., Lucas, P. J. et al., Antigen-independent differentiation and maintenance of effector-like resident memory T cells in tissues. *J. Immunol.* 2012. **188**: 4866–4875.
 - 29 Martin, B., Auffray, C., Delpoux, A., Pommier, A., Durand, A., Charvet, C., Yakonowsky, P. et al., Highly self-reactive naive CD4 T cells are prone to differentiate into regulatory T cells. *Nat. Commun.* 2013. **4**: 2209.
 - 30 Riolf-Blanco, L., Lazarevic, V., Awasthi, A., Mitsdoerffer, M., Wilson, B. S., Croxford, A., Waisman, A. et al., IL-23 receptor regulates unconventional IL-17-producing T cells that control bacterial infections. *J. Immunol.* 2010. **184**: 1710–1720.
 - 31 Richards, D. M., Ruggiero, E., Hofer, A.-C., Sefrin, J. P., Schmidt, M., von Kalle, C. and Feuerer, M., The contained self-reactive peripheral T cell repertoire: size, diversity, and cellular composition. *J. Immunol.* 2015. **195**: 2067–2079.
 - 32 Stritesky, G. L., Xing, Y., Erickson, J. R., Kalekar, L. A., Wang, X., Mueller, D. L., Jameson, S. C. et al., Murine thymic selection quantified using a unique method to capture deleted T cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 2013. **110**: 4679–4684.
 - 33 Zikherman, J., Parameswaran, R. and Weiss, A., Endogenous antigen tunes the responsiveness of naive B cells but not T cells. *Nature* 2012. **489**: 160–164.
 - 34 Moran, A. E., Holzapfel, K. L., Xing, Y., Cunningham, N. R., Maltzman, J. S., Punt, J. and Hogquist, K. A., T cell receptor signal strength in Treg and iNKT cell development demonstrated by a novel fluorescent reporter mouse. *J. Exp. Med.* 2011. **208**: 1279–1289.
 - 35 Kurts, C., Heath, W. R., Kosaka, H., Miller, J. F. and Carbone, F. R., The peripheral deletion of autoreactive CD8⁺ T cells induced by cross-presentation of self-antigens involves signaling through CD95 (Fas, Apo-1). *J. Exp. Med.* 1998. **188**: 415–420.
 - 36 Treiner, E., Duban, L., Bahram, S., Radosavljevic, M., Wanner, V., Tilloy, F., Affaticati, P. et al., Selection of evolutionarily conserved mucosal-associated invariant T cells by MR1. *Nature* 2003. **422**: 164–169.
 - 37 Wei, B., Wingender, G., Fujiwara, D., Chen, D. Y., McPherson, M., Brewer, S., Borneman, J. et al., Commensal microbiota and CD8⁺ T cells shape the formation of invariant NKT cells. *J. Immunol.* 2010. **184**: 1218–1226.
 - 38 Glas, R., Ohlén, C., Höglund, P. and Kärre, K., The CD8⁺ T cell repertoire in beta 2-microglobulin-deficient mice is biased towards reactivity against self-major histocompatibility class I. *J. Exp. Med.* 1994. **179**: 661–672.
 - 39 Tanaka, Y., Koido, S., Xia, J., Ohana, M., Liu, C., Cote, G. M., Sawyer, D. B. et al., Development of antigen-specific CD8⁺ CTL in MHC class I-deficient mice through CD4 to CD8 conversion. *J. Immunol.* 2004. **172**: 7848–7858.
 - 40 Tyznik, A. J., Sun, J. C. and Bevan, M. J., The CD8 population in CD4-deficient mice is heavily contaminated with MHC class II-restricted T cells. *J. Exp. Med.* 2004. **199**: 559–565.
 - 41 Tikhonova, A. N., Van Laethem, F., Hanada, K., Lu, J., Pobezinsky, L. A., Hong, C., Guinter, T. I. et al., $\alpha\beta$ T cell receptors that do not undergo major histocompatibility complex-specific thymic selection possess antibody-like recognition specificities. *Immunity* 2012. **36**: 79–91.
 - 42 Xiao, Z., Mescher, M. F. and Jameson, S. C., Detuning CD8 T cells: down-regulation of CD8 expression, tetramer binding, and response during CTL activation. *J. Exp. Med.* 2007. **204**: 2667–2677.
 - 43 Butcher, E. C. and Picker, L. J., Lymphocyte homing and homeostasis. *Science* 1996. **272**: 60–66.
 - 44 Akimova, T., Beier, U. H., Wang, L., Levine, M. H. and Hancock, W. W., Helios expression is a marker of T cell activation and proliferation. *PLoS One* 2011. **6**: e24226.
 - 45 Ohlén, C., Kalos, M., Cheng, L. E., Shur, A. C., Hong, D. J., Carson, B. D., Kokot, N. C. T. et al., CD8(+) T cell tolerance to a tumor-associated antigen is maintained at the level of expansion rather than effector function. *J. Exp. Med.* 2002. **195**: 1407–1418.
 - 46 McKinney, E. F., Lee, J. C., Jayne, D. R. W., Lyons, P. A. and Smith, K. G. C., T-cell exhaustion, co-stimulation and clinical outcome in autoimmunity and infection. *Nature* 2015. **523**: 612–616.
 - 47 Tilloy, F., Treiner, E., Park, S. H., Garcia, C., Lemonnier, F., de la Salle, H., Bendelac, A. et al., An invariant T cell receptor alpha chain defines a novel TAP-independent major histocompatibility complex class Ib-restricted alpha/beta T cell subpopulation in mammals. *J. Exp. Med.* 1999. **189**: 1907–1921.

Abbreviations: DN: double negative · GF: germ free · MAIT cell: mucosal-associated invariant T cell · PD-1: programmed cell death 1 · SLE: systemic lupus erythematosus · SPF: specific pathogen free

Full correspondence: Dr. José C. Crispín, Instituto Nacional de Ciencias Medicas y Nutrición Salvador Zubiran, Immunology and Rheumatology, Vasco de Quiroga 15, Mexico City, Mexico
e-mail: carlos.crispina@incmnsz.mx

Received: 7/9/2015

Revised: 23/2/2016

Accepted: 30/3/2016

Accepted article online: 6/4/2016

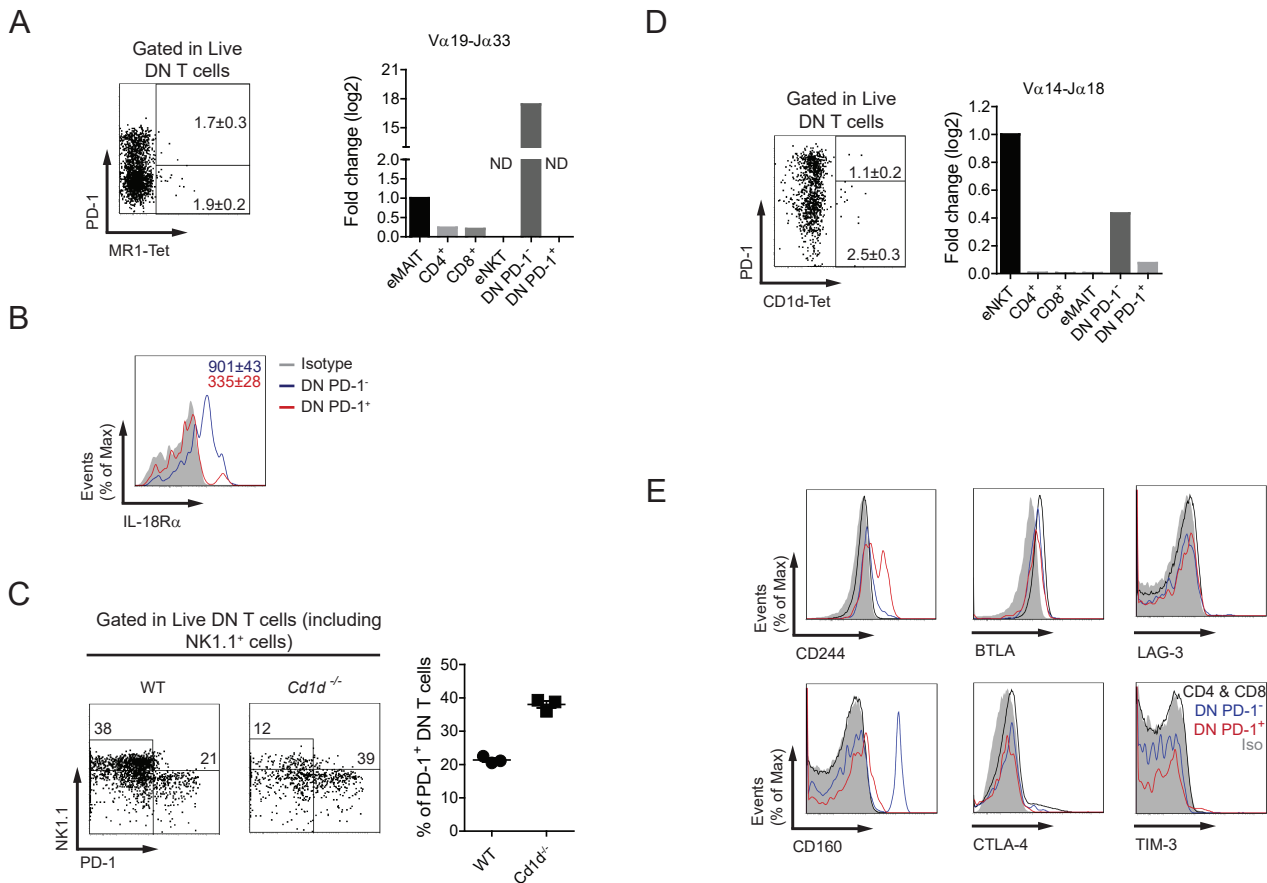
European Journal of Immunology

Supporting Information for DOI 10.1002/eji.201546056

Noé Rodríguez-Rodríguez, Sokratis A. Apostolidis, Lauren Fitzgerald, Bronwyn S. Meehan, Alexandra J. Corbett, José Manuel Martín-Villa, James McCluskey, George C. Tsokos and José C. Crispín

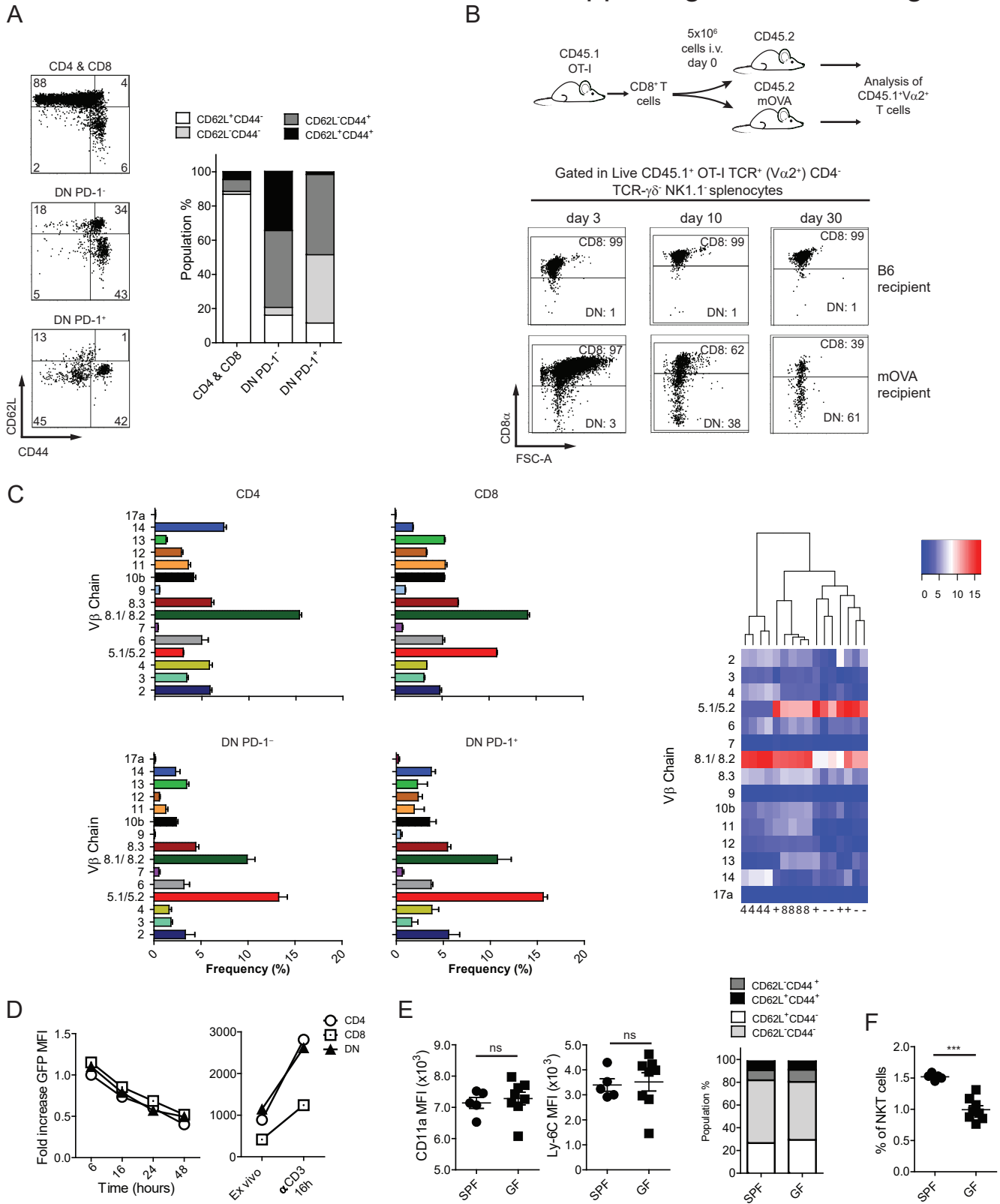
**Pro-inflammatory self-reactive T cells are found within murine
 $\text{TCR-}\alpha\beta^+\text{CD4}^-\text{CD8}^-\text{PD-1}^+$ cells**

Supporting Information Figure 1



Supporting information Figure 1. (A) Frequency of MR1-Tet⁺ cells among PD-1⁻ or PD-1⁺ DN T cells in the spleen of C57BL/6 mice (left) and relative expression (over eMAIT) of the TCR rearrangement Vα19-Jα33 RNA in the indicated populations (right; one experiment as in Fig. 1D; n= 25). (B) Levels (MFI) of IL-18Rα in PD-1⁻ and PD-1⁺ DN T cells (two experiments; n=5/experiment). (C) Analysis of PD-1 and NK1.1 expression within T cells from spleens of WT and *Cd1d*^{-/-} mice (one experiment, n= 3/group). DN T cells were defined as in Fig. 1A but including NK1.1⁺ cells. (D) Frequency of CD1d-Tet⁺ cells among PD-1⁻ or PD-1⁺ DN T cells in the spleen of C57BL/6 mice (left; two experiments; n=5/experiment) and relative expression (over eNKT) of Vα14-Jα18 rearrangement RNA in indicated populations (right; one experiment as in Fig. 1D; n= 25). (E) Expression of inhibitory coreceptors in PD-1⁻ and PD-1⁺ DN T cells compared to CD4 and CD8 counterparts in the spleen of C57BL/6 mice. Representative histograms from two experiments (n= 3/experiment). ND: non detectable. Data are expressed as mean ± SEM and were acquired by flow cytometry (A left, B, C, D left and E) or real time RT-PCR (A and D, right). Cumulative data come from pooling results from all the performed experiments.

Supporting Information Figure 2



Supporting information Figure 2. Phenotype of DN T cells. (A) Distribution of CD4⁺ together with CD8⁺ (CD4 & CD8), PD-1⁻ DN and PD-1⁺ DN T cells in the spleen according to CD44 and CD62L expression. Rep-representative plots (left panels) and cumulative data are shown (right). (B) Outline showing the experimental design (top) and the evolution in time of the adoptively transferred cells (bottom) in the spleen of recipient mice. Five million CD8⁺ T cells (purity > 95-97 %) from CD45.1⁺ OT-I mice were injected i.v. into congenic CD45.2⁺ mOVA mice. Donor cells were analyzed at days 3, 10 and 30 after transfer. (C) TCR V β repertoire (left panels) and cluster analysis (right panel) of CD4⁺ (4), CD8⁺ (8), PD-1⁻ (-) and PD-1⁺ (+) DN T cells. (D) Change of GFP levels over time in CD4⁺, CD8⁺ or DN T cells from Nur77-GFP mice seeded in plates and left unstimulated (left) or stimulated with α CD3 for 16 hours (right). (E) Activation phenotype of PD-1⁺ DN T cells in SPF and GF mice. (F) Percentage of NKT cells among splenocytes in SPF and GF mice. Data are expressed as mean \pm SEM and representative of one experiment (n=3-8).

Supporting information. Antibodies used for flow cytometry: anti-CD3 ϵ (145-2C11 and 17A2), anti-TCR- β (H57-597), anti-TCR- $\gamma\delta$ (GL3), anti-CD8 α (53-6.7), anti-CD4 (GK1.5), anti-NK1.1 (PK136), anti-CD49b (DX5), anti-B220 (RA3-6B2), anti-PD-1 (29F.1A12), anti-Helios (22F6), anti-Ly-6C (HK1.4), anti-CD62L (MEL-14), anti-CD44 (IM7), anti-CD69 (H1.2F3), anti-CD11a (2D7), anti-CD43 (1B11), anti-CD25 (PC61 and 3C7), anti-CD122 (TM- β 1), anti-CD127 (A7R34), anti-CD27 (LG.3A10), anti-CTLA4 (UC10-4B9), anti-CD160 (eBioCNX46-3 and 7H1), anti-BTLA (8F4), anti-2B4 (m2B4 (B6)458.1), anti-LAG-3 (C9B7W), anti-TIM-3 (B8.2C12), anti-V α 2 (B20.1), anti-CD45.1 (A20), anti-IL18R α (FAB1216F), anti-IL-2 (JES6-5H4), anti-TNF- α (MP6-XT22), anti-IL-17A (TC11-18H10.1), anti-IFN- γ (XMG1.2), anti-ROR- γ t (AFKJS-9) and anti-T-bet (4B10).

IV. Discusión General

Las células T DN representan un subgrupo de linfocitos T del cuya fisiología y función se conoce relativamente poco en comparación a sus contrapartes CD4⁺ y CD8⁺. Los resultados aquí presentados indican que los linfocitos TCR- $\alpha\beta$ ⁺ DN son una población que incluye varios tipos celulares cuya característica común es la de carecer de los co-receptores CD8 y CD4. En concreto, los linfocitos T DN que expresan PD-1 (DN PD-1⁺) no incluyen células NKT ni linfocitos MAIT, son independientes de la presencia de microbiota, muestran un fenotipo activado e indicadores de activación dependiente de TCR, y tienen propiedades principalmente pro-inflamatorias. Es muy probable que deriven de células T CD8⁺ autorreactivas que encuentran el antígeno específico en tejidos periféricos, ya que las células T DN derivadas de éstos (“self-reactive DN T cell”; srDNT) muestran un perfil de expresión molecular muy similar al de linfocitos DN PD-1⁺ que se encuentran en el bazo de ratones sanos. Su carácter autorreactivo se pone asimismo de manifiesto en modelos murinos de autoinmunidad, donde su proporción se encuentra incrementada.

Como se discutió en la introducción, los co-receptores CD4 y CD8 son moléculas cuyos niveles de expresión son activamente modulados por las células T en respuesta a reconocimiento antigénico u otras señales provenientes del medio, como es el caso de las citocinas (p. ej. IL-7)^{97,147,156,205}. Sin embargo, la conversión de un tipo celular a otro, en relación a sus co-receptores y que se observa en timocitos (es decir, células T CD8⁺ que tornan CD4⁺, o como nuestros resultados muestran aquí, de CD8⁺ a células srDNT) parece ser un fenómeno que ocurre más allá del timo. De este modo, células T CD8⁺ se diferencian hacia linfocitos CD4⁺ en los ganglios linfáticos mesentéricos en presencia de microorganismos comensales³³⁹, y células T CD4⁺ pueden diferenciarse hacia células CD8 $\alpha\alpha$ o CD4⁺CD8 $\alpha\alpha$ en el epitelio intestinal y adquirir propiedades citotóxicas y/o reguladoras^{20,126,340,341}. Del mismo modo, las células T CD8⁺ pueden convertirse en linfocitos T DN de en un proceso dependiente

de antígeno específico, posiblemente como parte de un mecanismo de tolerancia periférica alternativo a la ignorancia antigénica o a la eliminación de las células autorreactivas^{69,70}.

Aunque es incuestionable que el encuentro de una célula T CD8⁺ autorreactiva con su antígeno específico en tejidos periféricos ocasiona la pérdida de CD8 como mostramos en el primer bloque de resultados, no tenemos hasta el momento conocimiento de cómo la afinidad/avidez del TCR por pMHC afecta a este proceso. De hecho, la pérdida de CD8 podría ser un mecanismo alternativo a la regulación a la baja del TCR asociada a tolerancia periférica^{210,211}. En nuestros resultados, la formación de srDNT ocurría preferencialmente en aquellas células que mantenían niveles elevados de TCR, mientras que los linfocitos OT-I transferidos que modulaban a la baja la expresión del TCR, mostraban una menor proporción de srDNT. Recientemente, un estudio determinó que autoantígenos con una afinidad por el TCR menor a la del antígeno específico continuaban siendo capaces de provocar la activación de células autorreactivas e inducir diabetes³⁴², indicando que los procesos de tolerancia ocurren en un rango variado de afinidades y no únicamente con antígenos específicos. En nuestros experimentos, además de investigar si srDNT pueden generarse a partir de un repertorio policlonal de células T CD8⁺ pero de las cuales desconocemos la afinidad de cada TCR por su antígeno respectivo, empleamos dos TCR transgénicos: uno de menor sensibilidad por pMHC endógenos y antígeno específico (HY), y otro de mayor sensibilidad (OT-I)^{148,343,344}. No obstante, obtuvimos resultados similares en ambos modelos, nuevamente sugiriendo que los procesos de tolerancia periférica, y en este caso, la pérdida de CD8 y conversión a srDNT ocurren en células T con diversa afinidad por su antígeno específico.

En el caso de los TCRs transgénicos OT-I y HY en ratones que expresan como propio el antígeno específico (ratones OT-I.mOVA y ratones HY machos), la aparición de células T DN

puede deberse a la expresión anormalmente temprana (timocito DN) del TCR transgénico, pues estas células no se observan cuando estos TCRs se expresan en el estadio correcto del desarrollo de los timocitos (timocito DP)^{47,98}. Asimismo, puede que el fenotipo de las células T DN halladas en este caso sea similar al de IELs CD8 $\alpha\alpha$ intestinales o linfocitos T $\gamma\delta$ como sugieren varios trabajos^{50,51,99,345,346}. Si bien al comienzo del capítulo I de resultados nos servimos de ratones macho HY y de ratones transgénicos para la expresión de OVA (mOVA) y su TCR específico (OT-I), y esto podría indicar que los linfocitos T DN que describimos es una observación artefactual, nuestros modelos de transferencia no presentan dicho problema y emularían el encuentro de autoantígeno en la periferia por una célula T CD8⁺ autorreactiva genuina que haya escapado la selección negativa, sin ingenios derivados de la expresión del TCR transgénico. Si bien nosotros no tenemos resultados empleando células T autorreactivas que hayan escapado la selección negativa, circulen en periferia y cuya evolución podamos trazar o detectar, existe evidencia confirmada de que estas células existen^{34–36,105,347} por lo que la situación que representan nuestros modelos de transferencia es fisiológicamente factible.

Técnicamente hay varios aspectos a considerar que son importantes para aseverar el hecho de que las células T DN (srDNT o DN PD-1⁺) derivan de linfocitos T CD8⁺ autorreactivos. En todos los experimentos se cuidó que no hubiese contaminación de otras poblaciones celulares. La mayoría de los ensayos de transferencia celular se realizaron mediante el asilamiento por selección negativa de células, en general con una buena eficiencia (pureza \geq 95% para la población de interés, kits de aislamiento de MACS[®] de Miltenyi Biotech o Dynabeads[®] de Invitrogen). Para asegurarnos de que esa pequeña contaminación (\leq 5%; en la mayoría de los casos \leq 3%) no introducía ruido o artefactos en los resultados observados, corroboramos que la generación de srDNT ocurría de manera similar con linfocitos CD8⁺ OT-I

vírgenes inyectados en ratones mOVA aislados mediante citometría de flujo con una pureza virtual del 100%. Además, en todos nuestros experimentos había un ratón control que recibía PBS en lugar de células, con el fin de confirmar la ausencia de células endógenas que contaminasen la población de linfocitos donantes cuando realizásemos por citometría de flujo el análisis de la población transferida en los ratones recipientes. La población de células inyectadas se identificó mediante marcadores congénicos (CD45.1 o CD45.2, también conocidos como Ly5.1 o Ly5.2 respectivamente), para los cuales empleamos un doble marcaje: por ejemplo, se tiñeron simultáneamente con anti-CD45.1 conjugado a APC-Cy7 y con el mismo anticuerpo pero unido a PE-Cy7, de forma que se analizaban únicamente las células doble positivas para dicho marcaje, reduciendo así la contaminación debida a cierto posible grado de inespecificidad. Alternativamente, la formación de srDNT podría deberse a una población de células T DN que formen parte de las células transferidas. No obstante, además de lo que acabamos de mencionar respecto a que confirmamos los resultados con una población pura de células CD8⁺, las srDNT derivan de linfocitos CD8⁺ activados al encontrar su antígeno específico y que consecuentemente han proliferado (medido mediante la dilución de CFSE: los linfocitos T se marcan con CFSE antes de su activación; éste se incorpora irreversible y homogéneamente a las células, de forma que con cada división celular, las células hijas pierden la mitad de la cantidad de CFSE que tenía la célula madre, disminuyendo su fluorescencia). Los linfocitos T DN no son capaces de proliferar aun en presencia del antígeno, como se observa en la transferencia de células T totales aisladas de ratones HY: un treinta por ciento de los linfocitos que expresan el TCR transgénico son DN y éstos no proliferan al ser transferidos a ratones macho (mantenían alto nivel de CFSE, CFSE^{high}). Células T DN CFSE^{low} únicamente aparecían como consecuencia de la proliferación de linfocitos T CD8⁺, y en todo momento la población original de células T DN CFSE^{high}

permanecía inalterada con el transcurso de los días. Por último, aunque en general suele ser un porcentaje bastante pequeño de las células T en la periferia, los TCR transgénicos (y en cierta medida los TCRs endógenos en un repertorio policlonal) pueden ser editados en el timo y en la periferia, incluso desarrollando dos TCR con distinta especificidad^{103,348–350}. Para confirmar que la pérdida de CD8 únicamente ocurría en células OT-I y no era causada por edición del TCR empleamos linfocitos CD8⁺ derivados de ratones OT-I deficientes en *Rag1*, la enzima encargada de editar las cadenas α y β del TCR, de manera que todos los linfocitos T CD8⁺ únicamente poseen el TCR OT-I original. En este caso, al igual que con CD8⁺ derivados de OT-I con expresión normal de *Rag1*, observamos la regulación a la baja de CD8 y la aparición de srDNT PD-1⁺HELIOS⁺.

En el primer bloque de resultados, no cabe duda de la naturaleza autorreactiva de las células T DN, ya que se generan a partir de linfocitos T CD8⁺ cuyo antígeno específico se expresa en los ratones a los cuales se las transfiere. PD-1 y HELIOS emergen como marcadores que se expresan en estas srDNT y de los cuales nos servimos en el segundo bloque de resultados para identificar a una población equivalente, esto es linfocitos T DN autorreactivos que hayan podido generarse a partir de células CD8⁺. En el primer bloque validamos nuestro modelo con la transferencia de células provenientes de ratones deficientes en *Aire*, cuyo defecto en selección negativa de timocitos se traduce en un incrementado porcentaje de células T CD8⁺ autorreactivas^{57,60,63}. Como se mencionó, AIRE es un factor crítico en el desarrollo de las células epiteliales tímicas encargadas de la selección positiva y negativa de los timocitos, y necesario para la presentación en el timo de antígenos propios restringidos a ciertos tejidos o TRA (p. ej. insulina), de forma que se puedan eliminar los linfocitos reactivos contra éstos^{57,65,66,351}. Aunque no podemos identificar a las células T CD8⁺ autoreactivas entre las células transferidas, es de esperar que si las células DN derivan de linfocitos T CD8⁺

autorreactivos en un repertorio policlonal, una mayor proporción de células srDNT (en este caso identificadas como DN PD-1⁺) derivarían de una población enriquecida en linfocitos T CD8⁺ autorreactivos. Como comprobamos, hubo un aumento en células T DN que expresaban HELIOS y PD-1. Si este proceso no fuese fisiológicamente importante, no esperaríamos srDNT en la transferencia de células T CD8⁺ de ratones con expresión normal de *Aire*, sin embargo, el hecho de que podamos detectar cierta fracción de srDNT derivadas de éstas, y que su proporción aumente en linfocitos provenientes de ratones AireKO, apoya que la pérdida de CD8 es un proceso que ocurre en condiciones de homeostasis en el repertorio de células T CD8⁺.

Como se comenta en las discusiones de cada uno de los manuscritos, HELIOS está relacionado con la presencia crónica de antígeno y con células autorreactivas^{46,352–354}, al igual que ocurre con PD-1, cuya expresión se mantiene elevada en células autorreactivas y contiene su expansión y activación^{89,106,347}. Sin embargo, aunque ambos marcadores aparecen en estas poblaciones, quizá puedan sobre-expresarse en respuesta a otras señales como en el caso de PD-1, el cual, aunque parece requerir siempre señal vía TCR, es modulado por múltiples citocinas^{355–359}. Es por ello que además de PD-1 y HELIOS usamos varios marcadores que refieran a un estado activado de las células T y de forma corroborativa un ratón transgénico reportero de la activación de un linfocito a través de su TCR o BCR (ratón Nur77- o *Nr4a1*-GFP). Además de niveles altos de CD11a (LFA-1, “Lymphocyte function-associated antigen 1”), CD43 (antiguamente referido como 1B11, nombre del anticuerpo monoclonal que lo reconoce en ratón) y CD122 (IL-2R β), todos ellos marcadores que aumentan su expresión cuando las células T se activan, y bajos niveles de CD62L, observamos niveles disminuidos de Ly-6C en las células DN PD-1⁺, un marcador que aparece disminuido en situación de presencia continua de antígeno^{354,360,361}. Sin embargo, la prueba definitiva de que las células DN PD-1⁺

son linfocitos reactivos contra autoantígenos es que expresan altos niveles de GFP en ratones Nur77-GFP. Este ratón se ha utilizado ampliamente para detectar células que están siendo activadas específicamente vía TCR⁴⁹, así como células autoreactivas^{44,75,100,343}. La naturaleza de estos antígenos era principalmente endógena y no derivados de microbiota, ya que nuestros análisis fueron realizado con ratones en condiciones libres de patógenos (“specific-pathogen free”, SPF), y paralelamente no encontramos diferencias en el fenotipo de las DN PD-1⁺ en ratones completamente libres de microbiota (GF).

Si bien los niveles de Nur77-GFP son un método fiable para descubrir las células T autorreactivas, otro indicador que suele emplearse en ocasiones es el nivel CD5, ya que correlaciona con la fuerza de interacción del TCR con pMCH^{343,362} e incrementa cuando se activa el TCR^{44,363,364}. De forma interesante, observamos que en general las células DN PD-1⁺ tenían una menor expresión de CD5 que los linfocitos T CD8⁺ y CD4⁺, contrariamente a lo que se esperaría en linfocitos reactivos contra antígenos propios⁴⁴. Es posible que las células T DN disminuyan la expresión de CD5 a la par que pierden CD8. De forma alternativa, únicamente la expresión prolongada del GFP en ratones Nur77-GFP en comparación con la rápida disminución en la proteína endógena⁴⁹, permitiría detectar la reciente activación dependiente TCR de las células T DN, mientras que los niveles de CD5 disminuyen cuando el linfocito pierde CD8 y se reduce la intensidad de interacción con el pMHC. En cualquier caso, parece que tanto las células con baja expresión de CD5 como aquellas con altos niveles contienen una proporción equivalente de linfocitos autorreactivos, cuestionando que la expresión de esta molécula sea un marcador válido para detectar linfocitos autorreactivos⁷⁵.

En base a nuestros resultados, proponemos que la pérdida de CD8, al convertirse las células T CD8 autorreactivas en srDNT es un proceso de tolerancia periférica. La merma de

CD8 supone una disminución drástica en la afinidad/avidez del TCR por pMCH y la asociada activación de una célula T^{132,365–367}. En consecuencia, la falta del mismo ocasionaría que una célula ignore la presencia de su antígeno. No obstante, parece que además de tolerancia por falta de reconocimiento antigénico, la célula srDNT pierde la capacidad de responder, esto es, proliferar y producir citocinas en respuesta a la estimulación por TCR. Esto se confirma por la ausencia de patología en los ratones mOVA y RIP-mOVA, y se apoya en el hecho de que el modelo de transferencia aquí empleado ha sido ampliamente utilizado como modelo de estudio de tolerancia periférica^{79,368}. Además, la elevada expresión de PD-1 y HELIOS muy probablemente contribuye a mantener a las células srDNT en reposo. Está bien establecido que la transferencias de OT-I a ratones mOVA y RIP-mOVA induce tolerancia en las linfocitos OT-I por medio de tolerancia delecional (eliminación de las células autorreactivas mediante apoptosis) e induciendo un estado de “anergia” en las células T CD8⁺ restantes^{76–79}. Sin embargo, la mayoría de estudios previos analizaban las células CD8⁺ o aquellas células detectables mediante tetrámeros dentro de la población transferida, sin ocuparse de la existencia de una población que no fuese alguna de ellas. Una ventaja de nuestro sistema es que analizamos globalmente las células transferidas que conservan niveles altos del TCR transgénico OT-I, lo cual nos permite detectar por primera vez estas células srDNT, linfocitos que probablemente antes no estaban siendo consideradas como parte de la población recuperada. Así, se añade un tercer mecanismo de tolerancia quedando: 1) ignorancia, 2) eliminación por apoptosis y 3) pérdida de CD8 y conversión a srDNT. En este sentido, este es el primer estudio a nuestro conocimiento que describe la acumulación de células T DN en individuos sanos sin defectos celulares en apoptosis. Previamente se había descrito una acumulación de linfocitos T DN en ratones con TCR transgénico deficientes en Fas²¹⁷, lo cual apoya la idea de que las células DN solamente estaban asociadas a defectos en la apoptosis

de células T, probablemente como consecuencia de linfocitos CD8⁺ o CD4⁺ transitando hacia apoptosis. De forma interesante, que un antígeno propio induzca activación o tolerancia parece también depender de su localización y densidad/concentración^{69,70,369}. De hecho, mientras que las células OT-I son tolerizadas al transferirse a ratones mOVA o RIP-mOVA, estas mismas células montan una respuesta inmune patológica en ratones K14-OVAp (expresando OVA en queratinocitos), lo cual fue originalmente atribuido a que OVA era presentada de forma inmunogénica por células de Langerhans de la piel^{79,103}. No obstante, de forma más reciente se demostró que las células de Langerhans eran dispensables para la activación de linfocitos autorreactivos. Usando un modelo similar al K14-OVAp, K14-mOVA, los autores observaron que las células T CD8⁺ eran tolerizadas, lo que indica que no solo la APC, pero también la naturaleza intrínseca del antígeno y su nivel de expresión pueden inducir tolerancia o autoinmunidad^{102,370}.

Aunque PD-1 y HELIOS podrían ser sencillamente marcadores de activación, dado su papel en control de la tolerancia y respuesta inmunes^{74,347,371}, seguramente tengan un papel importante en la conversión de células T CD8⁺ autoinmunes hacia srDNT o en el control de los linfocitos DN PD-1⁺. HELIOS se definió originalmente como un factor de transcripción que identificaba Tregs naturales o derivadas de timo^{372,373}. Posteriormente se observó que también podía expresarse por Tregs inducidas en periferia y en células activadas^{353,374,375}, si bien seguía siendo crucial en la homeostasis de Tregs CD4⁺ y CD8⁺, estabilizando su fenotipo supresor, en parte mediante el control de la expresión y activación de STAT5^{74,376,377}. HELIOS, codificado por *Ikzf2*, es un factor de transcripción de la familia de IKAROS asociado tanto a inhibición como a promoción de la transcripción⁷⁴. Aunque en células B y NK su expresión parece asociarse a una mayor reactividad^{378,379}, su papel en linfocitos T parece ser predominantemente inhibidor. Una elevada expresión de HELIOS se asocia con el

silenciamiento de *IL2* y el agotamiento de las células T^{354,380}. Asimismo, la inhibición de la actividad de HELIOS, causada por isoformas con una función negativa dominante encontradas en pacientes con leucemias, promueve la proliferación y linfomagénesis de células T^{381,382}. No obstante su papel más allá de Tregs se encuentra poco definido, con reportes que incluso indican que no influyen en el desarrollo y función de linfocitos T^{383,384}.

El papel de PD-1 en el control de la activación de los linfocitos T y tolerancia inmunitaria está ampliamente confirmado^{88,347,371,385,386}. PD-1 inhibe la activación de linfocitos T modulando a la baja la activación del TCR/CD28^{92,93,387}, de la vía PI3K/AKT/mTOR^{388,389} y el metabolismo celular^{390,391}. Del mismo modo, la señalización a través de PD-1 bloquea la señal de parada en células T y evita que estas establezcan con las APC una sinapsis inmune productiva^{90,392}. En este sentido, la ausencia de CD8 y la expresión de PD-1 actuarían en sinergia y evitarían que las células autorreactivas puedan siquiera reconocer su antígeno. Alternativamente, en condiciones de tolerancia, PD-1 podría estar inhibiendo la excesiva señalización de la vía de mTOR descrita en células T DN en LES y SLPA^{221,329}. PD-1 es también un inhibidor de la proliferación y controla el ciclo celular y expansión de las células T mediante la inducción de los inhibidores p27 y p15^{393,394}. Si bien en linfocitos T DN no se han analizado los niveles de p27 y p15, p21, molécula con función similar a p27, se ha sugerido como factor importante en la inhibición y expansión de células T DN en un modelo murino de lupus³³², por lo que PD-1 podría estar también controlando a las células srDNT/DN PD-1⁺ mediante la inducción de estos inhibidores.

Control de la conversión de células CD8 a srDNT

¿Qué células y mecanismos son responsables de la pérdida de CD8 y la conversión a srDNT? Aunque actualmente nos encontramos investigando esta pregunta, los resultados

aquí presentes indican que al menos depende del encuentro del linfocito T con su antígeno específico asociado a moléculas MHC de clase I expuesto por las APC (profesionales, como es el caso de las DC; o no profesionales, como por ejemplo, fibroblastos o células epiteliales) residentes del tejido donde se expresa activamente el antígeno e incapaces de migrar a otros órganos. Esta conclusión se obtiene del análisis de las srDNT obtenidas de ratones RIP-mOVA, donde éstas únicamente podían detectarse en páncreas y riñón, tejidos donde se expresa la mOVA bajo el control del promotor de insulina de rata³⁶⁸, y no en otros tejidos como el bazo o el hígado. Es importante hacer notar que en el bazo y en el hígado las células T CD8⁺ OT-I fueron activadas por la presencia del antígeno, probablemente presentado por alguna APC que migrase de tejidos expresando mOVA, como se deduce del hecho que proliferaron; sin embargo esta activación no se vio asociada a la pérdida de CD8, como ocurrió en el riñón y el páncreas. Alternativamente, la conversión del linfocito T CD8⁺ a srDNT se produjo exclusivamente en estos dos últimos tejidos, pero las únicas células capaces de emigrar hacia otros órganos eran aquellas que conservaban la expresión de CD8. Otra posibilidad, es que las srDNT se formen en tejidos linfoides donde no se expresa in situ el antígeno propio, pero a los que migran desde el tejido donde se expresa el TRA las APC profesionales que inducen la pérdida de CD8 en las células T, las cuales (ya sea en forma de CD8⁺ o srDNT) posteriormente migran y se acumulan en los tejidos que poseen el TRA. Idealmente, experimentos identificando si el MHC es requerido en células hematopoyéticas o células radioresistentes, y co-transferencia de DC de ratones mOVA y CD8⁺ a ratones no transgénicos podrían ayudar a acotar la naturaleza de las APC y posteriormente investigar que función tienen y que factores sintetizan las mismas para mediar la conversión hacia srDNT. Es importante destacar que si bien las DN PD-1⁺ descritas en el segundo bloque de resultados se acumulaban preferencialmente en el bazo en comparación a los otros órganos linfoides

secundarios en ratones sanos y no manipulados, no podemos descartar que las células T DN no representen una importante fracción de los linfocitos residentes que pueblan otros tejidos³⁹⁵. De hecho, además de asociadas a tejidos diana en enfermedades autoinmunes^{280,296}, las células T DN se han detectado en biopsias de riñón y piel de individuos sanos^{259,300,396}. En nuestro caso, el hecho de que no encontremos una acumulación de linfocitos DN PD-1⁺ en ganglios linfáticos, puede deberse a que las DN PD-1⁺ carecen de CD62L y Ly-6C, dos moléculas requeridas para la migración leucocitaria hacia estos órganos pero no hacia el bazo^{397,398}. De forma equivalente, en la transferencia de células T OT-I CD8⁺ a ratones mOVA, las srDNT se detectaban principalmente en el bazo, pero no en ganglios linfáticos periféricos (datos no mostrados).

Respecto a las señales que propician la conversión de células T CD8 autoreactivas hacia srDNT, parece que la inflamación generalizada no es un factor que determine el destino de las CD8. La transferencia de OT-I CD8⁺ a ratones mOVA durante inflamación generalizada inducida por una inyección de LPS (lipopolisacárido) no afectó de forma notoria la diferenciación de CD8 a srDNT. Si bien es cierto que la inflamación generalizada afecta la respuesta inmune y puede darse activación inespecífica de las células T^{105,399–402}, parece que las APC son capaces de discriminar entre péptidos endógenos y exógenos durante una infección, manteniendo la tolerancia hacia autoantígenos^{403,404}. En consonancia con ello, el LPS no es capaz de inhibir la diferenciación hacia srDNT. Empleando células de ratón, hemos sido incapaces de reproducir *in vitro* lo observado *in vivo* (datos no mostrados). La conversión a células T DN a partir de CD8⁺ no parece depender de la ausencia o presencia de co-estimulación (cultivos con anticuerpo contra CD28, co-cultivo con células DC inmaduras o activadas o co-cultivo con fibroblastos), de la presencia o ausencia de citocinas de la familia del receptor γ común, o de la intensidad con la que se activa el TCR (concentraciones variables

de anti-CD3 o estimulación de células OT-I con variantes de su antígeno específico SIINFEKL con menor afinidad³⁴). Probablemente esto se deba a la ausencia de alguna señal presente *in vivo* de la que carecemos en los cultivos celulares. Por ejemplo, la presencia de Tregs, IL-10, TGF- β o las restricciones metabólicas son señales que afectan profundamente la activación de las células T, y que por tanto son posibles promotores candidatos en la conversión a srDNT^{36,359,405–407}. En este sentido, se requiere extensa investigación para determinar qué factores extrínsecos e intrínsecos promueven la transdiferenciación de linfocitos CD8 hacia células T srDNT. Asimismo, si bien nuestra transferencia de células OT-II y células T CD4⁺ policlonales de ratones AireKO no mostraron la conversión hacia srDNT, no podemos descartar con total certeza que los linfocitos DN no derivan de células CD4⁺ autorreactivas en otras situaciones o modelos.

Paralelamente, los factores de transcripción que promueven el silenciamiento de *Cd8* en estas células se desconocen. Probablemente los mismos factores que actúan en el timo y que recientemente se han visto actuar en la periferia en células CD4⁺ que adquieren expresión de CD8 estén implicados en la regulación a la baja de *Cd8*^{20,126}. Así, puede que RUNX3 juegue un papel importante dada su función crítica en el establecimiento del linaje de células CD8⁺ y promoción de la expresión de CD8⁴². En lo que al promotor del locus de *Cd8* respecta, la región *E8I* parece ser necesaria para mantener constantes los niveles de CD8 cuando una célula T se activa^{159,161,162}. Recientemente se observó que la acetilación del locus de *Cd8* por la acetiltransferasa KAT6A era imprescindible para retener los niveles de CD8 durante la diferenciación de linfocitos vírgenes a efectores¹⁶¹, por lo que defectos en la inducción de esta enzima o en el control del estado de epigenético de locus de *Cd8*, podrían promover la pérdida de CD8. Así pues, es posible que la inducción/función de estos factores esté reprimida en células T CD8⁺ siendo tolerizadas, de forma que el linfocito no es capaz de mantener la

expresión de *Cd8*; y puede incluso que otros factores que contribuyen al linaje CD4 y al silenciamiento del programa transcripcional de los linfocitos T CD8⁺, como THPOK, colaboren en este silenciamiento. De forma interesante, y quizá apuntando a una des-represión de THPOK que permita la expresión de genes asociados a linfocitos CD4⁺ cooperadores, los linfocitos T CD8⁺ adquieren un fenotipo similar al de células Th17 al convertirse en srDNT, característica que también presentan las DN PD-1⁺ (producción de IL-17A y expresión de ROR- γ t). Puede que esto se deba a una trans-activación mediada por THPOK en ausencia de RUNX3 que sea permisiva al establecimiento de programas de células T cooperadoras^{42,169,170}. SATB1, necesario para la re-expresión de CD8 tras su regulación a la baja en timocitos seleccionados positivamente, podría estar implicado¹⁷². Recientemente se ha visto que SATB1 es necesario para la modulación de PD-1 y que su presencia promueve niveles bajos del mismo⁴⁰⁸. Aunque carente de ninguna evidencia preliminar y totalmente hipotético, puede que en el proceso de conversión de células CD8⁺ a srDNT no se induzca adecuadamente SATB1, y consecuentemente no se exprese CD8 y aparezcan niveles altos de PD-1 como es lo que observamos en nuestro sistema.

Tolerancia versus Inflamación (Figura 5 y 8)

Las srDNT obtenidas en los modelos de transferencia, así como las DN PD-1⁺ son células incapaces de responder al antígeno específico y a estimulación por anti-CD3. Además expresan HELIOS y PD-1 y tienen bajos niveles de Ly-6C, fenotipo observado en células agotadas en situaciones de infecciones crónicas y cáncer^{86,106,354}. Aunque en estos contextos los linfocitos T CD8⁺ exhaustos suelen expresar diversos receptores inhibidores en adición a PD-1⁸⁵, ni las srDNT ni las DN PD-1⁺ co-expresan otros receptores inhibitorios (p. ej. LAG3, 2B4 o CTLA-4) sugiriendo que las srDNT son linfocitos tolerizados, no agotados. No obstante,

tolerancia e agotamiento parecen ser dos procesos altamente relacionados^{94,409}. Tanto en tumores como en infecciones crónicas, como en el caso de células autorreactivas que escapan la selección negativa, estos linfocitos se encuentran con la presencia crónica de antígeno junto con un microambiente que no promueve una respuesta inmune óptima. Es por ello que cabe la posibilidad que las células T DN se generen, de forma similar a lo que ocurre cuando son tolerizadas, en infecciones crónicas y en tumores. Esta idea es altamente hipotética pero el hecho de que se hayan encontrado células T DN en tumores la apoya.

Aunque no presentamos datos en linfocitos T humanos, resultados preliminares indican que PD-1 podría asimismo identificar células autorreactivas en humanos. De hecho, en LES hemos observado que las células PD-1⁺CD45RA⁻ (CD45RA empleado aquí como marcador de células vírgenes) están incrementadas dentro de los linfocitos T DN en LES (resultados no publicados). Como en los ratones, estas células T DN incrementadas en LES y SS excluyen NKT²⁸⁰, y en nuestro análisis de células DN PD-1⁺ en humanos excluimos las MAIT mediante el uso de un anticuerpo contra el TCR utilizado por éstas (Vα7.2). La ausencia de MAITs se ve apoyada por el hecho de que la proporción de MAITs dentro de células mononucleares de sangre periférica (PMBC, de sus siglas “peripheral blood mononuclear cells”) está reducida en pacientes con lupus, de nuevo indicando que los linfocitos T DN incrementados en LES son una subpoblación discreta y distinta de NKT y MAIT. No obstante, a pesar de los resultados que indican que son pro-inflamatorias^{197,280}, no tenemos evidencia directa de una posible naturaleza autorreactiva de las mismas. En el caso de linfocitos CD8⁺ y CD4⁺, las células autorreactivas pueden identificarse con tetrámeros de MHC o midiendo la proporción de células efectoras o producción de citocinas al estimular linfocitos con antígenos propios^{35,36,410,411}. Sin embargo, las células T DN pierden su capacidad de unir tetrámeros (datos no mostrados), como ocurre con células que no pierden CD8, pero disminuyen

significativamente su expresión en superficie¹⁵⁶, ya que CD8 es imprescindible para que los tetrámeros se unan al TCR³⁵. Además, si bien parece que en SLPA puede proliferar *in vitro*²²¹, en el caso de LES y de individuos sanos los linfocitos T DN no responden a estimulación por TCR^{197,267}, de forma similar a lo observado con nuestras srDNT derivadas de CD8 o lo experimentado en ratones *lpr*³³⁷. Junto a lo anterior, el hecho de que no se conozcan antígenos contra los que puedan ser reactivas las células T DN convierte en una tarea ardua identificar si en esta población hay células autorreactivas y de ser así, si están aumentadas en enfermedades autoinmunes. Dos recientes artículos, sin embargo, pueden proporcionar nuevos métodos para detectar células autorreactivas. NUR77 también parece ser un marcador fiable de activación vía TCR en células T humanas⁴¹², lo cual podría, junto con PD-1 y HELIOS, ayudar a delimitar una subpoblación de linfocitos T autorreactivos en humanos. No obstante, al contrario que con los modelos murinos, donde el análisis de ratones GF asegura que las células activas que se encuentran en el individuo son autorreactivas, en humanos aun cabe la posibilidad de que células identificadas por la expresión de NUR77 sean sencillamente linfocitos respondiendo a alguna infección subyacente. Junto con NUR77, el desarrollo de dodecámeros de MHC¹¹⁵ podría proporcionar cierto avance en la detección de linfocitos srDNT. Si bien sería necesario conocer qué antígenos son aquellos reconocidos por las células T DN, el uso de dodecámeros en lugar de tetrámeros aumenta la sensibilidad para detectar células específicas de entre 2 a 100 veces, permitiendo que incluso en ausencia de CD8, los linfocitos T DN sean detectadas.

Nuestros resultados indican que las células T DN, si bien son incapaces de proliferar, tienen una capacidad pro-inflamatoria potencialmente alta, lo cual es coherente con resultados en humanos reportando que los linfocitos T DN tienen una conformación de la cromatina permisiva a un perfil inflamatorio²⁸⁵. Es importante destacar que la mayoría de los

experimentos en los que se analiza la producción de citocinas se empleó PMA e ionomicina para promover la producción de citocinas. De hecho, la estimulación a través del TCR o con antígeno específico no propició la producción de citocinas (datos no mostrados), en consonancia con reportes previos que indican que estas células son hiporesponsivas^{197,267,337}. En otros experimentos únicamente detectamos los niveles de transcritos (*Il22*, *Il17f*) o la actividad transcripcional (ratón IL17A-GFP) de ciertas citocinas. Sin embargo esto no tiene por

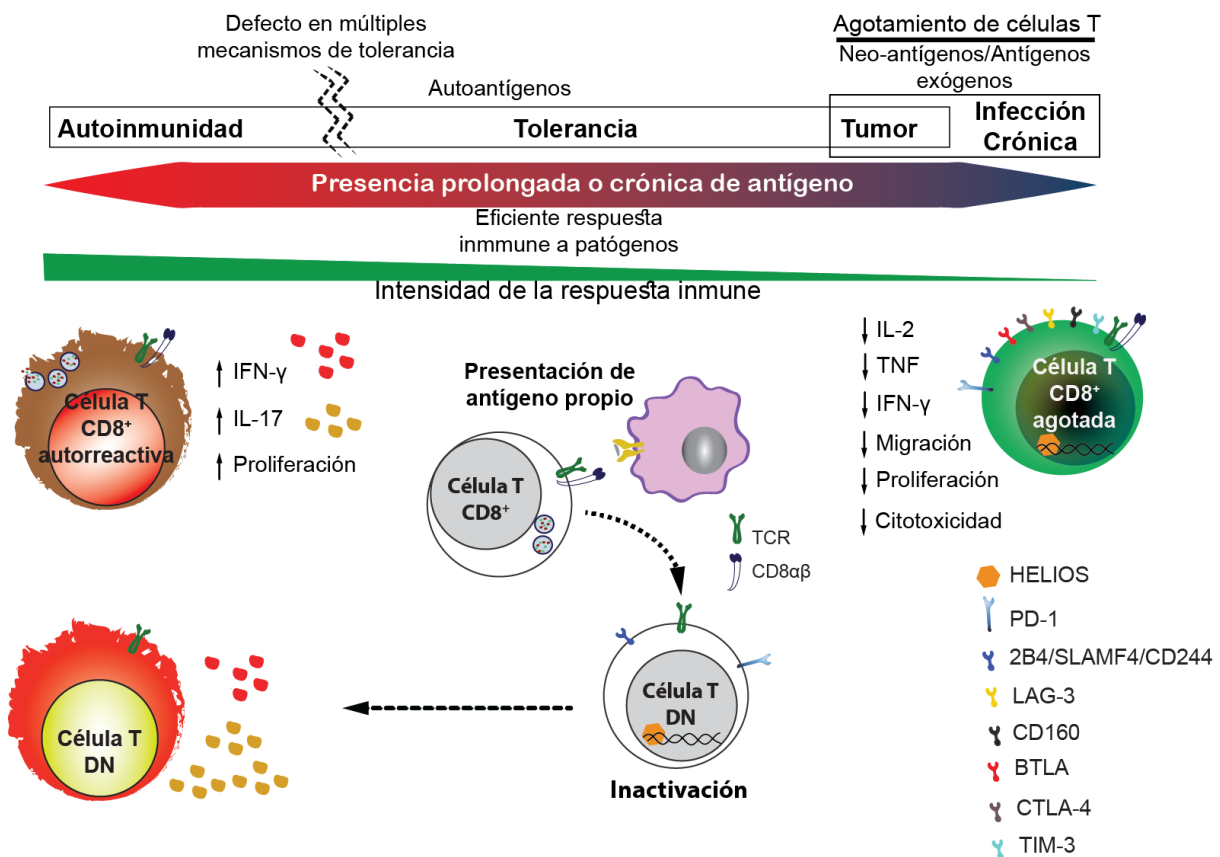


Figura 5. Tolerancia, autoinmunidad y agotamiento. Los procesos de tolerancia inmune y agotamiento pueden observarse desde una misma perspectiva como procesos donde se modula a la baja la respuesta inmunitaria a antígenos presentes de forma crónica. En ambos, las células T tienen deficiente habilidad para proliferar y producir citocinas pro-inflamatorias, y son en gran parte modulados por receptores de membrana con función inhibitoria. Los dos pueden representar mecanismos evolutivos para evitar la inmunopatología asociada a respuestas inmunes e inflamación exacerbadas contra tejidos propios, ya sea por un ataque dirigido contra dicho tejido, ya sea por la presencia de un patógeno que no puede ser eliminado pero cuya colonización quiera limitarse. De este modo, si bien reactivar células T agotadas puede ser beneficioso, reactivar linfocitos tolerizados, en ambas situaciones factible mediante el bloqueo de receptores inhibidores, lleva a la autoinmunidad.

qué traducirse en la producción y secreción de las mismas, ya que a pesar de expresar altos niveles de transcritos de citocinas, el control de la tolerancia puede forzarse mediante un bloqueo a nivel traduccional⁴¹³, o en el control de la proliferación, en lugar del control de la producción de citocinas⁸². Es por ello que el potencial pro-inflamatorio que observamos en las células T DN no entra en conflicto con que se generen durante la inducción de tolerancia inmune y la ausencia de patología en ratones. Puede que si los mecanismos de tolerancia que subyacen a la inactividad de los linfocitos T DN fallan, estas células muy probablemente medien inmunopatología, como ocurre en el LES, SS y modelos murinos relacionados^{113,280,296,302}. Una observación interesante es que las células T CD8 que se convierten en srDNT adquieren la capacidad de producir cantidades importantes de IL-17A, citocina poco asociada a CTL. Si bien IL-17A es la citocina identificativa de las células Th17 y el control de su producción se ha estudiado extensamente¹¹², cómo se regula en células CD8⁺ es bastante controvertido. No obstante, la existencia de células Tc17 o CD8 con capacidad de secretar IL-17, particularmente asociadas a GVHD, autoinmunidad, alergia y deficientes en tumores está ampliamente constatada^{414–419}. En el caso que nos ocupa, cómo la inducción de tolerancia, perder CD8 y convertirse en srDNT pueden permitir que la célula se torne productora de IL-17 es algo que requiere mayor investigación. Una posibilidad derivaría de la observación de que al disminuir la intensidad de la señalización a través del TCR se fomenta la producción de IL-17A⁴²⁰, lo cual es coherente con que la deficiencia de CTLA-4 perjudica la diferenciación hacia Tc17⁴²¹ o que células que pierden CD8 produzcan IL-17A como mostramos en el primer bloque de resultados. En colación a esto, la deficiencia de PD-1 en células T DN, ya sea en ratones no manipulados y sanos, ya sea srDNT derivadas de CD8, disminuye de forma significativa la producción de IL-17A al estimular las mismas con PMA/Ionomicina (datos no publicados). La inestabilidad cromosómica también promueve la

producción de IL-17. Así, células con sobre-expresión de PP2A adquieren la capacidad de producir IL-17 vía IRF4 y ROCK1/2 y remodelación de la cromatina⁴²², y células CD8 deficientes de los factores de transcripción BLIMP-1 y T-BET que no pueden asegurar su programa de diferenciación hacia CTL producen IL-17A⁴²³. En este sentido, puede que por mecanismos desconocidos, la imposibilidad del linfocito T CD8⁺ de activarse de forma apropiada y expresar factores de transcripción que aseguren su estabilidad, “abran la puerta” a la producción de IL-17A.

Escape de la tolerancia (Figuras 6, 7 y 8)

¿Cómo las células T DN evaden los efectos de la ausencia de CD8 y la presencia de PD-1 durante su activación? Como se discutió anteriormente, CD8 y CD4 principalmente estabilizan la unión TCR con el pMHC y transportan p56^{lck} y LAT a la sinapsis inmunológica. Muchos subtipos celulares no requieren CD8 ni CD4 para ser capaces de señalizar a través del TCR (p. ej. MAIT, NKT células T $\gamma\delta$), por lo que debe haber mecanismos no dependientes de co-receptor para activar el TCR y la señalización río abajo. De este modo, aunque CD8 contribuya generalmente con p56^{lck120}, parece que el evento inicial que transduce en activación el reconocimiento del pMHC por el TCR está mediado por p56^{lck} libre, no unida a co-receptor, y que en ausencia de co-receptores p56^{lck} libre promueve la activación de timocitos^{121,319}. Asimismo, una reserva de p56^{lck} pre-activada podría existir en células T DN como ocurre en linfocitos T de memoria efectores y, en conjunto con lo anterior, facilitar la activación del TCR a pesar de la ausencia de CD8³¹⁷.

Bajo condiciones patológicas, particularmente en condiciones con defectos de tolerancia y autoinmunidad, donde varias vías de señalizaciones están hiperactivas^{38,320}, otras moléculas podrían estabilizar la sinapsis inmune o disminuir el umbral de activación de modo

que las células T DN puedan reconocer antígenos presentados por las APC. Evidencia que sustenta esta hipótesis reside por ejemplo en el hecho de que defectos en PTPN22 promueven autoinmunidad^{424,425}. La ausencia completa o variantes hipo-activas de PTPN22 disminuyen el umbral de activación del TCR, y contribuyen a la activación de la integrina LFA-1, que promueve la interacción entre APC y célula T^{426,427}. Los linfocitos T DN poseen elevada expresión de LFA-1, de modo que defectos como los presentes en las enfermedades autoinmunes activarían LFA-1 permitiendo a la célula T DN reconocer su antígeno.

Alternativamente a LFA-1, otras moléculas podrían contribuir a “sustituir” la función de CD8. Las células T DN PD-1⁺ expresan Sca-1/Ly-6A (datos no publicados), un marcador de superficie que caracteriza a células madre hematopoyéticas, pero cuya función se conoce de forma muy somera. Los linfocitos T de memoria modulan a la alta Sca-1 tras encontrar antígeno propio durante una infección, pero parece que la ausencia de Sca-1 no afecta a las respuestas inmunes contra patógenos⁴²⁸. Sin embargo, en 1990, Flood y colaboradores observaron que la reducción de *Ly6a* mediante ARN de interferencia, reducía la activación de las células T en respuesta a ConA o anti-CD3⁴²⁹. Esta inhibición no fue observada en estimulación con PMA/Ionomicina, que evita los eventos de señalización próximos a TCR (fosforilación de p56^{lck}, de ZAP-70, etc.) activando directamente PKC y la entrada de calcio, sugiriendo que Sca-1 podría tener un papel positivo en la activación celular vía TCR, y que de tenerlo, este sería en la señalización proximal, como ocurre con CD8/p56^{lck}. Sca-1 interacciona con p59^{fyn}⁴³⁰ y aunque no existen estudios valorando la siguiente posibilidad, puede que Sca-1/p59^{fyn} sustituya a CD8/p56^{lck} y colabore en la fosforilación de CD3ζ y reclutamiento de ZAP-70. De hecho, aunque no a través de Sca-1, p59^{fyn} participa en la activación cooperativa del TCR mediada por el receptor de IL-12Rα⁴³¹ y es crítica para la proliferación de las células T DN en ratones B6.Fas^{lpr}, cuya acumulación promueve paralelamente la IL-12^{321,432}. Asimismo,

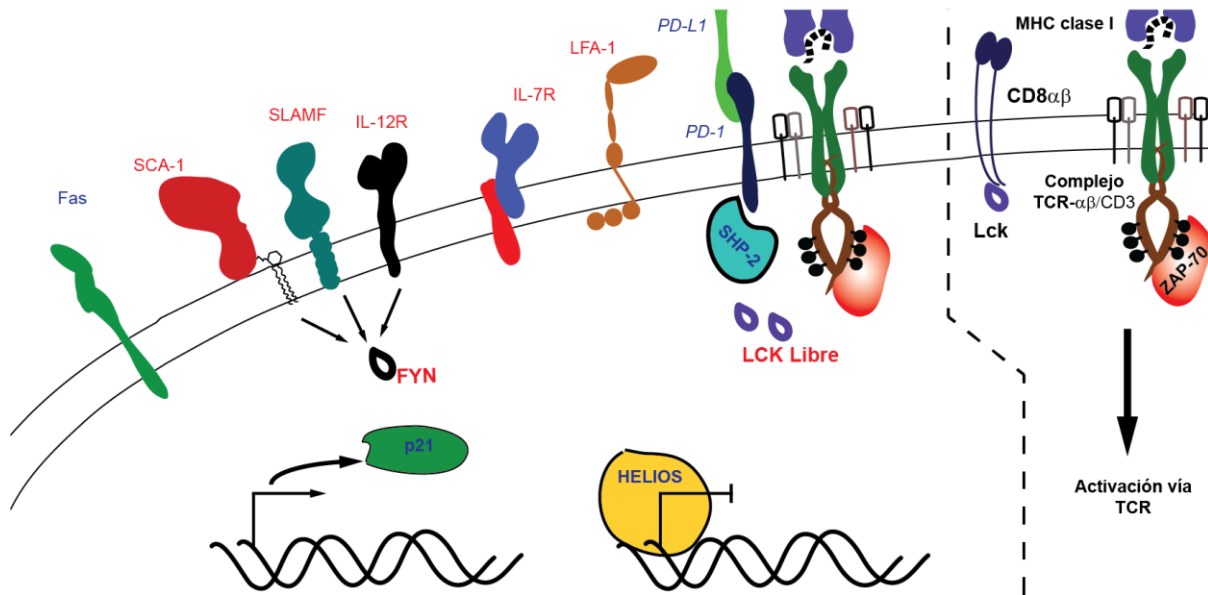


Figura 6. Señalización en células T doble negativas. Una activación convencional de la célula T a través de su TCR requiere de CD8 y de la interacción pMHC-TCR (derecha). En ausencia de CD8 y la proteína asociada $p56^{lck}$, varias moléculas, como Fas o LFA-1 podrían favorecer la estimulación del TCR y rebasar la inhibición de PD-1. Alternativamente, la señalización inducida directamente por IL-7, o a vía $p59^{fyn}$ desde Sca-1, moléculas de la familia de SLAM o IL-12R, proporcionarían señales co-estimulatorias. A nivel intracelular SHP-2 asociada a PD-1, HELIOS y p21 actuarían como frenos para la reactivación de las células T DN autorreactivas.

$p59^{fyn}$ también interacciona con los receptores de la familia de SLAM ("signaling lymphocytic activation molecule")^{433,434}, capaces de contribuir a la activación de células T. La expresión y función de los mismos están alterados en LES³³⁵, lo que podría sugerir una relación entre la activación y expansión de linfocitos T DN potenciada por proteínas SLAMF.

Defectos en la expresión de PD-1 y su señalización se han descrito en condiciones autoinmunes y en particular en LES^{94,435}. Si el papel de PD-1 en las células T DN es tal que su ausencia sortea la falta de CD8, los linfocitos T DN podrían expandirse cuando hay defectos de PD-1, como efectivamente ocurre en ratones deficientes de PD-1, especialmente al cruzarse con Fas^{lpr} ⁸⁸, sugiriendo otra alternativa para la re-activación de células T DN tolerizadas.

Asimismo, existen condiciones asociadas a autoinmunidad que podrían favorecer la respuesta y proliferación de linfocitos que tengan baja afinidad por su pMHC específico. Tal es el caso de la linfopenia, condición asociada con LES⁴³⁶ y capaz de promover proliferación homeostática de células T y disminuir el umbral de activación de células autorreactivas, ello mediado parcialmente por IL-7 y su receptor CD127 (IL-7R α)^{227,427}. De este modo, en condiciones de linfopenia, el umbral de activación de los linfocitos T DN disminuiría y permitiría la activación del TCR en ausencia de CD8, e incluso disminuiría paralelamente la expresión de PD-1, debido a la inhibición que ejerce sobre la expresión del mismo la IL-7^{437,438}.

Además de qué mecanismos son aquellos que podrían permitir la reactivación de las células T DN autorreactivas, como se muestra en la figura 7, existen varios procesos o defectos de los mismos que podrían explicar la acumulación de los linfocitos DN en enfermedades autoinmunes. En base a las observaciones de otros investigadores y a nuestros resultados, aquellas células T CD8⁺ con especificidad para antígenos endógenos que escapasen a la selección negativa en el timo migrarían a la periferia donde encontrarían el antígeno específico y podrían activarse o ignorarlo. En el primer escenario, en condiciones de homeostasis y tolerancia, estos linfocitos serían eliminados por apoptosis o perderían CD8 convirtiéndose así en células T DN (srDNT). Estas células permanecerían quiescentes en tejidos linfoides como el bazo o en otros tejidos no linfoides en la periferia y algunas podrían activar procesos de muerte celular programada. Defectos en los mecanismos de tolerancia propiciarían que éstas, empero, se acumulasen. Así, una selección negativa deficiente conllevaría al exceso de linfocitos T CD8⁺ autorreactivos y en consecuencia a una mayor proporción de células que se convertirían en srDNT (p. ej. nuestros experimentos con ratones AireKO). Defectos en la eliminación de linfocitos T CD8⁺ autorreactivos activados (p. ej. en la vía de Fas/FasL) o alteraciones que favorezcan un sesgo hacia la pérdida de CD8 (cabe la

posibilidad de que también aquí influyan defectos en la ruta de Fas/FasL), promoverían la acumulación de linfocitos T DN; como también lo ocasionaría una deficiente inhibición de la activación y proliferación de las células T CD8⁺ (p. ej. condiciones de linfopenia o exceso de IL-7/IL-15). Finalmente, fallos en la apoptosis de células T DN al reactivarse o que les permitan

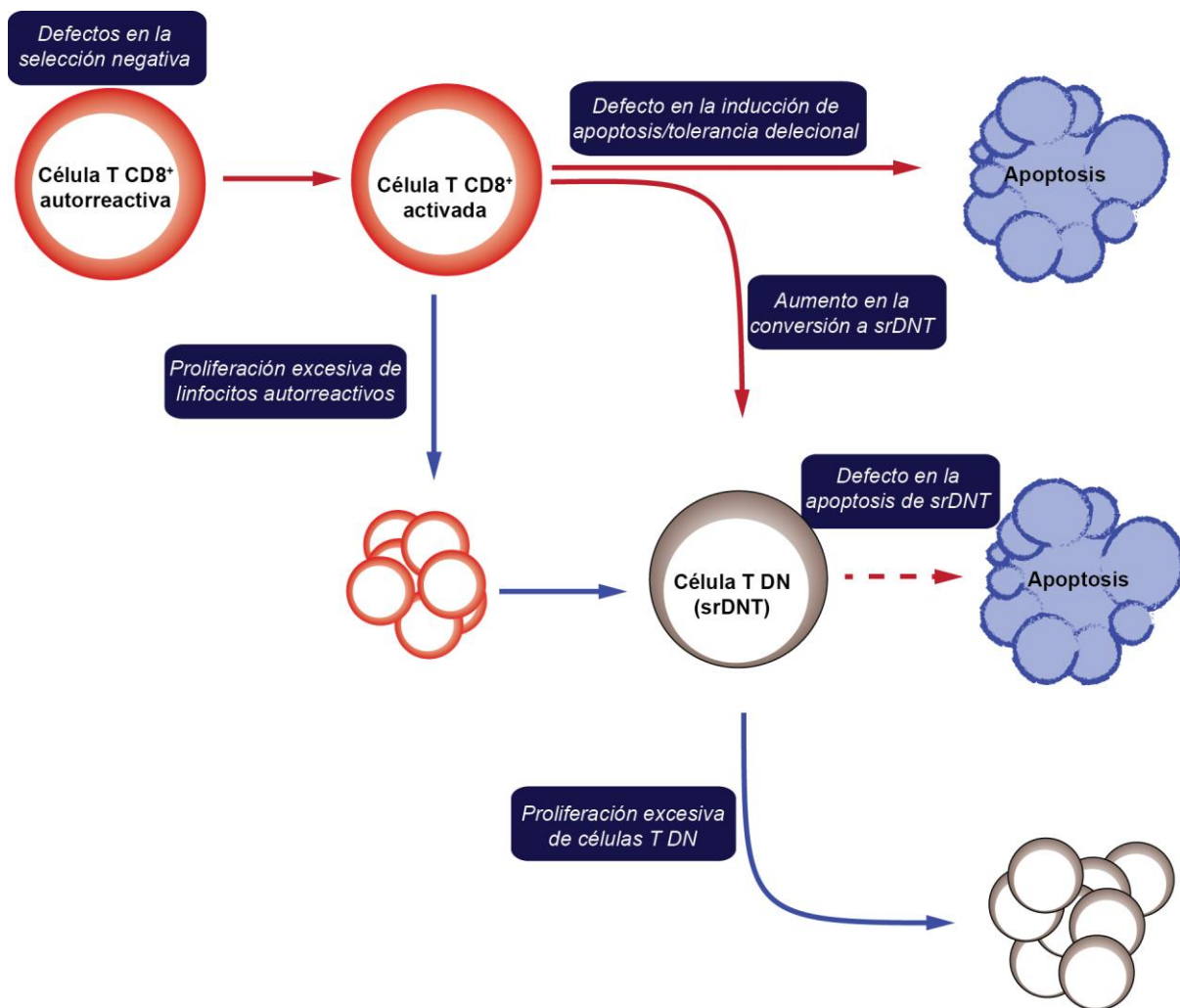


Figura 7. Causas de la acumulación de srDNT/DN PD-1⁺. En condiciones de homeostasis, cierto porcentaje de células T CD8⁺ representa linfocitos T autorreactivos que han escapado la tolerancia central en el timo. Éstos pueden activarse en presencia de autoantígeno específico y, según nuestro modelo, morir vía apoptosis o transformarse en célula T DN, que a su vez se mantendrán quiescentes o serán eliminadas. No obstante, defectos en los mecanismos de tolerancia como los observados en las enfermedades autoinmunes podrían promover la acumulación de linfocitos T DN. De este modo, un incremento de células T CD8⁺ autorreactivas, como el observado en ratones *Aire*^{-/-}, podría incrementar la fracción habitual de células que se convierten en srDNT. Asimismo, fallos en el mantenimiento de la quiescencia de estos linfocitos T DN o en sus mecanismos pro-apoptóticos, favorecerían la proliferación/incremento de los mismos. Por último, defectos en la inactividad de células T CD8⁺ autorreactivas que favorezcan su proliferación, o una exagerada conversión a srDNT, también cursarían con una proporción aumentada de linfocitos T DN.

proliferar y responder a la presencia de autoantígeno específico (p. ej. alteración de las vías de señalización, linfopenia o deficiente vía de Fas/FasL), de igual forma cursarían con un exceso de linfocitos srDNT que podrían contribuir a la patogenia y progresión de la condición autoinmune. No obstante, asumiendo que las células T DN en humanos pueden albergar linfocitos autorreactivos como ocurre en el ratón, desconocemos cuál o cuáles de estas alteraciones son las responsables del incremento de linfocitos T DN observado en LES, SLPA o el síndrome de Sjögren.

Células Pro-inflamatorias versus Células Regulatoras

En relación a la naturaleza pro-inflamatoria o regulatoria de las células T DN, la elevada capacidad de producir citocinas pro-inflamatorias pero no antiinflamatorias (IL-10 o TGF- β 1), y la ausencia de supresión *in vitro* por parte de las srDNT derivadas de CD8, apoyan que los linfocitos T DN, al menos aquellos identificadas por la expresión de PD-1, no tienen capacidad reguladora.

Un estudio previo usando células T CD8 con el TCR HY que utilizamos nosotros también en el primer bloque de resultados²¹⁶ muestra cómo tras la estimulación *in vivo* mediante tetrámeros de solubles de HY-D^b, algunas células se convierten en linfocitos CD8^{low} con inhabilidad de activarse con re-estimulación (similar a anergia) y con cierta capacidad anti-inflamatoria. En este caso, nuevamente y como comentábamos en la introducción, los autores necesitan altas cantidades de células T DN para observar la actividad supresora de las mismas. Esta observación, en apariencia contradictoria con nuestros resultados, podría explicarse por diferencias en el método por el que se generan las células CD8^{low} o en nuestro caso los linfocitos T DN, esto es, mediante tetrámeros solubles o mediante activación por autoantígeno específico respectivamente. Esta diferencia también se ilustra en que los

linfocitos T CD8^{low} mantienen un fenotipo de célula inactivada, mientras que las DN PD-1⁺ y srDNT modulan a la baja CD62L y aumentan los niveles de CD44 tras encontrar el antígeno.

Los linfocitos T DN han sido identificados como supresores en un modelo que resulta en autoinmunidad severa y que es similar a nuestro modelo de transferencia OT-I CD8⁺→ratones mOVA. En una cepa de K14-mOVA diferente a la mencionada anteriormente^{102,104}, Miyagawa y colegas mostraron que la transferencia de células T OT-I CD8⁺ a ratones K14-mOVA precipitaba la aparición de autoinmunidad en los ratones receptores. Esto se evitaba si dichas células se transferían a ratones doble transgénicos para OT-I y K14-mOVA, ya que, de acuerdo con los autores, los linfocitos T DN que aparecen en estos ratones (de manera similar a lo que observamos en ratones macho HY o OT-I.mOVA en la Figura 1 del primer manuscrito o capítulo) tienen capacidades reguladoras. Si bien *in vivo* la ausencia de patología autoinmune en estos ratones OT-I.K14-mOVA apoya el papel supresor, como mencionábamos en la introducción, en este caso se necesitaban 2.5 DN por célula efectora para observar un efecto similar *in vitro*, y de la misma forma ocurre para otros estudios que estudian la naturaleza supresora de los linfocitos T DN²⁴⁸.

Además del hecho que se comentó en la introducción en relación a la posibilidad de que diversos subtipos leucocitarios se incluyan dentro de la población T DN (o CD8^{low}, como en algunos textos se refieren), algunos con capacidad supresora, otros con capacidad pro-inflamatoria clásica y otros tolerizados o inactivos, otra posibilidad es que las células T DN no sean reguladoras y sean meramente linfocitos inactivados o incapaces de responder que compiten física y metabólicamente por la presentación de antígeno y factores tróficos y quimiotácticos dificultando la respuesta de linfocitos T efectores y teniendo un efecto pasivo que se confunde con función supresora. En relación a esto, Voelkl y colaboradores⁴³⁹ reportan

que este no es el caso para una población de células T DN en humanos descrita en su trabajo, pero no se puede descartar que si sea el caso de otras poblaciones reguladoras DN observadas. La competición entre poblaciones de linfocitos T por interaccionar con MHC y por citocinas ha sido documentada en varias ocasiones^{54,56}. Linfocitos anérgicos convencionales no reguladores pueden fungir como supresores⁴⁴⁰; sin embargo éstos no representan un linaje diferenciado como ocurre con otras células T reguladoras (p. ej. linfocitos Tr1, Tregs CD4⁺ FOXP3⁺ o células reguladoras CD8 reactivas contra Qa-1). De hecho, el concepto de que linfocitos T convencionales (esto es, no reguladores) vírgenes pueden mediar supresión de células efectora mediante regulación homeostática no es nuevo y se ha visto con anterioridad⁴⁴¹. Aunque en algunos modelos, la inmunodominancia (es decir, la competición de células T por recursos, como por ejemplo la unión a pMHC) no parece inhibir la respuesta y activación de linfocitos T⁴⁴², diversos trabajos han demostrado que la inmunodominancia sí que puede inhibir la respuesta dirigida hacia el mismo o diferentes antígenos cuando estos son presentados por la misma APC^{443–449}. De hecho, las células CD8^{low} que describen Maile y colaboradores²¹⁶ no pueden suprimir la activación de células T de memoria, probablemente debido a una mejor capacidad de estas para proliferar y competir por el antígeno⁴⁵⁰. Por todo ello, aunque no se puede aseverar la ausencia de células T DN reguladoras, investigaciones rigurosas extra son necesarias para definir la existencia de tales linfocitos y poder aplicarlos en la clínica, en particular en inmunidad del trasplante, como originalmente se pretendía²⁴⁵.

En resumen, aunque nuestros resultados ponen de manifiesto la relevancia la pérdida de CD8 y la conversión a srDNT como un mecanismo de tolerancia periférica para células T CD8⁺ autorreactivas, así como sugieren la existencia de varios subtipos de linfocitos T DN, uno de ellos con un mayor potencial pro-inflamatorio y que puede reconocerse por la expresión de PD-1, todavía queda mucho que investigar para comprender la relevancia y mecanismos

que median este proceso. Ello nos permitirá esclarecer qué procesos son deficientes en enfermedades autoinmunes y si estas células tienen capacidad patogénica *in vivo* y determinar su importancia y función en individuos sanos y pacientes.

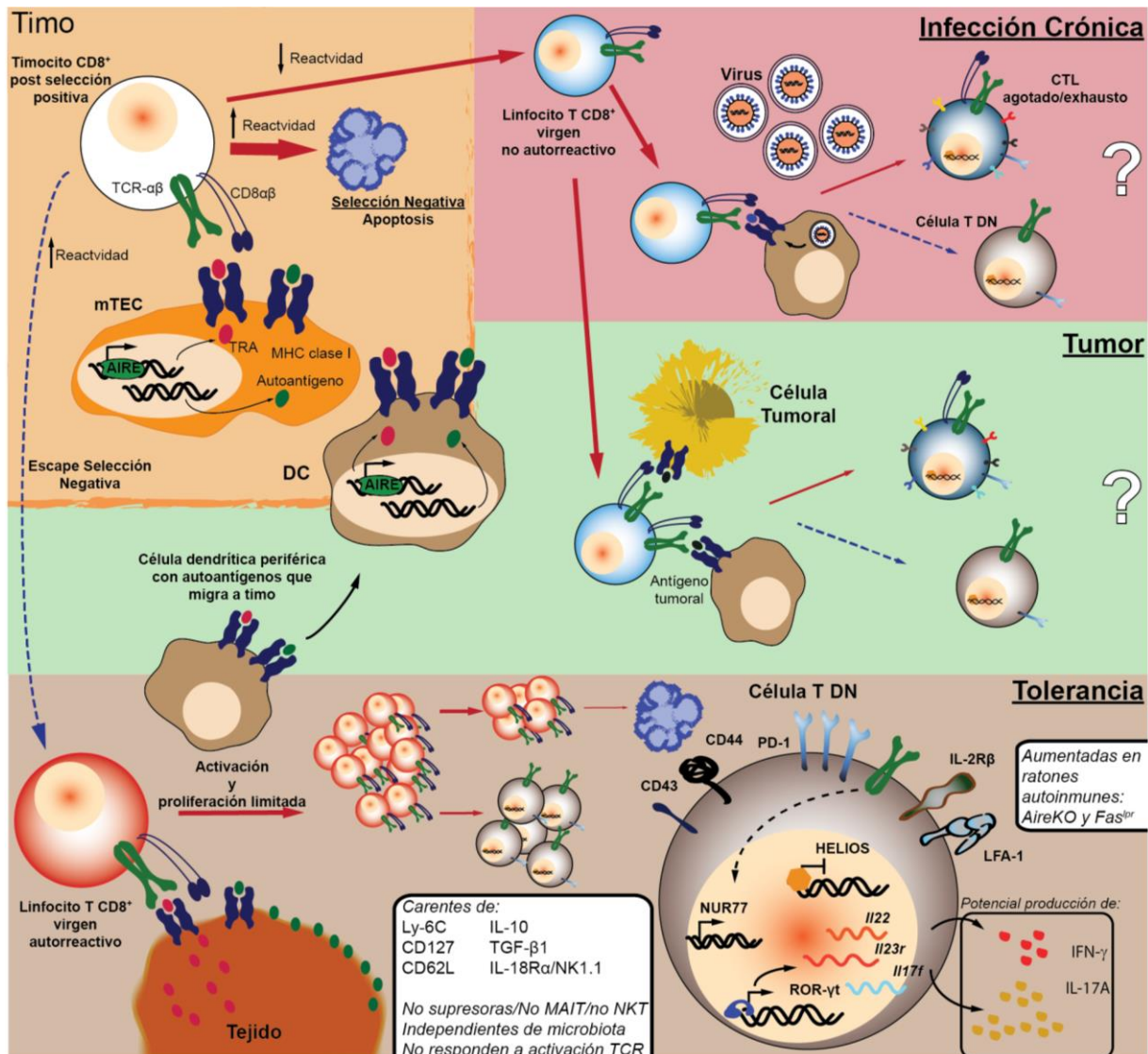


Figura 8. Vías de formación y características de las srDNT/DN-PD-1⁺. Los timocitos CD8⁺ autorreactivos son en su mayoría eliminados en el timo mediante la selección negativa a cargo de las mTECs; sin embargo, aquellos linfocitos autorreactivos que escapan al proceso de tolerancia central, migran a tejidos periféricos. Allí encuentran el antígeno específico presentado como propio y presentado de forma crónica, y tras una breve activación acompañada de cierto grado de proliferación, estas células T pueden ser eliminadas por apoptosis. De forma alternativa, una fracción de ellas, cuyas características iniciales se desconocen, pierden CD8 y adquieren un fenotipo característico, así como la capacidad de producir citocinas pro-inflamatorias. Es posible que células T no autorreactivas, específicas para neo-antígenos y antígenos asociados a infecciones crónicas, puedan también perder la expresión de CD8 debido a la presencia crónica del antígeno en un microambiente subóptimo para la estimulación de linfocitos T CD8⁺, rasgos asociados a la tolerancia inmune periférica.

V. Conclusiones Generales

1. La proporción de células T DN aumenta en ratones con TCR transgénico que expresan el antígeno específico como antígeno propio.
2. Los linfocitos T DN (srDNT) derivan de células T CD8⁺ vírgenes con TCR transgénico cuando éstas son transferidas a ratones que expresan el antígeno específico como propio y es presentado en la periferia. Sin embargo, las células srDNT no se acumulan cuando estos mismos linfocitos T CD8⁺ responden a su antígeno específico asociado a una infección o presentado como antígeno foráneo, sin que la inflamación generalizada y no asociada al antígeno parezca afectar a la formación o acumulación de las srDNT.
3. La pérdida de CD8 y generación de srDNT solamente se observa en aquellos tejidos que expresan activamente el antígeno específico como propio, si bien la activación de linfocitos T CD8⁺ autorreactivos ocurre en tejidos que no expresan el antígeno. Asimismo, las células srDNT no parecen derivar de linfocitos T CD4⁺ autorreactivos activados o de un repertorio policlonal de células T CD4⁺ enriquecidas en células autorreactivas.
4. La expresión de HELIOS y de PD-1 caracterizan a los linfocitos T DN derivados de células T CD8⁺ autorreactivas. Estas células, al igual que las células DN PD-1⁺ (y HELIOS⁺) presentes en ratones sanos y no manipulados, muestran bajos niveles de Ly-6C y elevada expresión de CD44, CD43, LFA-1, IL-2R β .
5. La generación de células T DN PD-1⁺ se incrementa partir de un repertorio policlonal de linfocitos T CD8⁺ que está enriquecido en células autorreactivas. Paralelamente, la proporción linfocitos DN PD-1⁺ está significativamente incrementada en ratones con defectos en mecanismos de tolerancia y que desarrollan autoinmunidad (AireKO y B6.Fas^{lpr}).

6. Los linfocitos DN PD-1⁺/srDNT tienen una capacidad incrementada de producir interleucinas pro-inflamatorias, ya sea ésta medida a nivel de transcrito, ya sea a nivel de proteína. Las srDNT adquieren la capacidad de expresar IL-17A y las DN PD-1⁺ muestran mayor producción de la misma en comparación a sus contrapartes PD-1⁻. Ambas poblaciones expresan mayores niveles de ROR- γ t que las células T CD8⁺, CD4⁺ o DN PD-1⁻.
7. Las células srDNT y los linfocitos T DN PD-1⁺ muestran un fenotipo muy similar sugiriendo que se trata de la misma población. El carácter autorreactivo de las células T DN PD-1⁺ es confirmado por la expresión de GFP en ratones *Nr41a*-GFP. Además, éstas presentan un repertorio de cadenas de TCR V β similar al de células T CD8⁺, y dependen de la expresión de molécula MHC de clase I.
8. Las células srDNT no pueden proliferar en respuesta a estimulación a través del TCR y no muestran un fenotipo de linfocito T regulador: no suprimen la proliferación *in vitro* de linfocitos y no producen cantidades detectables de IL-10 ni TGF- β 1.
9. Los linfocitos T DN PD-1⁺ son una subpoblación celular discreta de linfocitos TCR- $\alpha\beta$ ⁺ que no incluye células MAIT ni NKT. La presencia y fenotipo de las células DN PD-1⁺ no se altera en ratones GF indicando que su ontogenia y activación depende de antígenos endógenos y no derivados de la microbiota.

V. General Conclusions

1. The proportion of DN T cells increases in TCR transgenic mice that express the cognate antigen as self.
2. DN T lymphocytes (srDNT) derived from naïve CD8⁺ T cells bearing transgenic TCR when they are adoptively transferred to mice that expressed the cognate antigen as self and is presented in the periphery. However, srDNT cells do not accumulate when the same CD8⁺ T cell lymphocytes respond to cognate antigen associated to an infection or presented as foreign, with generalized non-antigen-associated inflammation not affecting the generation and accumulation of srDNT.
3. The loss of CD8 and the formation of srDNT is exclusively observed in those tissues that expressed actively the cognate antigen as self, despite the activation of self-reactive CD8⁺ T lymphocytes occurring in tissues that do not express the antigen. Likewise, srDNT cells do not appeared to derive from activated self-reactive CD4⁺ T lymphocytes or from a policlonal CD4⁺ T cell repertoire enriched in self-reactive cells.
4. HELIOS and PD-1 expression are characteristic of self-reactive CD8-derived DN T lymphocytes. These cells, like PD-1⁺ (HELIOS⁺) DN T cells found in healthy unmanipulated mice, display low levels of Ly-6C and overexpress CD44, CD43, LFA-1 and IL-2R β .
5. PD-1⁺ DN T cell generation is increased in a policlonal CD8⁺ T lymphocyte repertoire that is enriched in self-reactive cells. Similarly, the proportion of PD-1⁺ DN T lymphocytes is significantly enlarged in mice with defects in tolerance mechanism that develop autoimmunity (AireKO and B6.Fas^{lpr}).
6. PD-1⁺ DN/srDNT lymphocytes have a prominent capacity to produce pro-inflammatory cytokines, regardless of this being measured at mRNA or protein level. srDNT cells acquire the ability to express IL-17A and PD-1⁺ DN cells show a higher

production compared to PD-1⁻ DN T lymphocytes. Both populations express greater levels of ROR- γ t than CD8⁺, CD4⁺ or PD-1⁻ DN cells.

7. srDNT and PD-1⁺ DN T lymphocytes display a similar phenotype suggesting they are the same cell subset. The self-reactive nature of PD-1⁺ DN T cells is confirmed by the expression of GFP in *Nr41a*-GFP mice. In addition, these cells present a TCR V β chain usage close to that of CD8⁺ T cells, and it depends on the expression of MHC class I.
8. srDNT cells cannot proliferate upon TCR stimulation and do not show features of regulatory T lymphocytes: they do not suppress *in vitro* lymphocyte proliferation and do not produce detectable quantities of IL-10 or TGF- β 1.
9. PD-1⁺ DN T lymphocytes constitute a distinct cellular subset within TCR- $\alpha\beta$ ⁺ lymphocytes, different from MAIT and NKT cells. The presence and phenotype of PD-1⁺ DN T cells is not altered in GF mice indicating that their ontogeny and activation depends on endogenous antigens and not on microbiota-derived ones.

VI. Bibliografía

1. Litman, G. W., Rast, J. P. & Fugmann, S. D. The origins of vertebrate adaptive immunity. *Nat. Rev. Immunol.* **10**, 543–53 (2010).
2. Pancer, Z. & Cooper, M. D. The evolution of adaptive immunity. *Annu. Rev. Immunol.* **24**, 497–518 (2006).
3. Goldberg, G. W. & Marraffini, L. A. Resistance and tolerance to foreign elements by prokaryotic immune systems - curating the genome. *Nat. Rev. Immunol.* **15**, 717–24 (2015).
4. Koonin, E. V & Krupovic, M. Evolution of adaptive immunity from transposable elements combined with innate immune systems. *Nat. Rev. Genet.* **16**, 184–92 (2015).
5. Brubaker, S. W., Bonham, K. S., Zanoni, I. & Kagan, J. C. Innate immune pattern recognition: a cell biological perspective. *Annu. Rev. Immunol.* **33**, 257–90 (2015).
6. Schatz, D. G. & Ji, Y. Recombination centres and the orchestration of V(D)J recombination. *Nat. Rev. Immunol.* **11**, 251–63 (2011).
7. Boehm, T. Design principles of adaptive immune systems. *Nat. Rev. Immunol.* **11**, 307–17 (2011).
8. Call, M. E. & Wucherpfennig, K. W. The T cell receptor: critical role of the membrane environment in receptor assembly and function. *Annu. Rev. Immunol.* **23**, 101–25 (2005).
9. Van Rhijn, I., Godfrey, D. I., Rossjohn, J. & Moody, D. B. Lipid and small-molecule display by CD1 and MR1. *Nat. Rev. Immunol.* **15**, 643–54 (2015).
10. Neefjes, J., Jongsma, M. L. M., Paul, P. & Bakke, O. Towards a systems understanding of MHC class I and MHC class II antigen presentation. *Nat. Rev. Immunol.* **11**, 823–36 (2011).
11. Koch, U. & Radtke, F. Mechanisms of T Cell Development and Transformation. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **27**, 539–62 (2011).
12. Krueger, A., Zięta, N. & Łyszkiewicz, M. T Cell Development by the Numbers. *Trends Immunol.* **38**, 128–39 (2017).
13. Zúñiga-Pflücker, J. C. Innovation: T-cell development made simple. *Nat. Rev. Immunol.* **4**, 67–72 (2004).
14. Mingueneau, M. *et al.* The transcriptional landscape of $\alpha\beta$ T cell differentiation. *Nat. Immunol.* **14**, 619–32 (2013).
15. Malchow, S. *et al.* Aire Enforces Immune Tolerance by Directing Autoreactive T Cells into the Regulatory T Cell Lineage. *Immunity* **44**, 1102–13 (2016).
16. Klein, L., Kyewski, B., Allen, P. M. & Hogquist, K. A. Positive and negative selection of the T cell repertoire: what thymocytes see (and don't see). *Nat. Rev. Immunol.* **14**, 377–91 (2014).
17. Starr, T. K., Jameson, S. C. & Hogquist, K. A. Positive and negative selection of T cells. *Annu. Rev. Immunol.* **21**, 139–76 (2003).

18. Kimura, M. Y. *et al.* Timing and duration of MHC I positive selection signals are adjusted in the thymus to prevent lineage errors. *Nat. Immunol.* **17**, 1415–23 (2016).
19. Egawa, T. Regulation of CD4 and CD8 coreceptor expression and CD4 versus CD8 lineage decisions. *Adv. Immunol.* **125**, 1–40 (2015).
20. Mucida, D. *et al.* Transcriptional reprogramming of mature CD4⁺ helper T cells generates distinct MHC class II-restricted cytotoxic T lymphocytes. *Nat. Immunol.* **14**, 281–9 (2013).
21. Kaplan, M. H., Hufford, M. M. & Olson, M. R. The development and in vivo function of T helper 9 cells. *Nat. Rev. Immunol.* **15**, 295–307 (2015).
22. Tubo, N. J. *et al.* Single naive CD4⁺ T cells from a diverse repertoire produce different effector cell types during infection. *Cell* **153**, 785–96 (2013).
23. Gagliani, N. *et al.* Th17 cells transdifferentiate into regulatory T cells during resolution of inflammation. *Nature* **523**, 221–5 (2015).
24. Levings, M. K. *et al.* Human CD25⁺CD4⁺ T suppressor cell clones produce transforming growth factor beta, but not interleukin 10, and are distinct from type 1 T regulatory cells. *J. Exp. Med.* **196**, 1335–46 (2002).
25. Hori, S., Nomura, T. & Sakaguchi, S. Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science* **299**, 1057–61 (2003).
26. Chinen, T. *et al.* An essential role for the IL-2 receptor in Treg cell function. *Nat. Immunol.* **17**, 1322–33 (2016).
27. León, B., Bradley, J. E., Lund, F. E., Randall, T. D. & Ballesteros-Tato, A. FoxP3⁺ regulatory T cells promote influenza-specific Tfh responses by controlling IL-2 availability. *Nat. Commun.* **5**, 3495 (2014).
28. Bevan, M. J. Helping the CD8(+) T-cell response. *Nat. Rev. Immunol.* **4**, 595–602 (2004).
29. Harty, J. T. & Badovinac, V. P. Shaping and reshaping CD8⁺ T-cell memory. *Nat. Rev. Immunol.* **8**, 107–19 (2008).
30. Harty, J. T., Tvinnereim, A. R. & White, D. W. CD8⁺ T cell effector mechanisms in resistance to infection. *Annu. Rev. Immunol.* **18**, 275–308 (2000).
31. Walch, M. *et al.* Cytotoxic cells kill intracellular bacteria through granzysin-mediated delivery of granzymes. *Cell* **157**, 1309–23 (2014).
32. Kim, H.-J., Verbinnen, B., Tang, X., Lu, L. & Cantor, H. Inhibition of follicular T-helper cells by CD8(+) regulatory T cells is essential for self tolerance. *Nature* **467**, 328–32 (2010).
33. Anderson, M. S. *et al.* The cellular mechanism of Aire control of T cell tolerance. *Immunity* **23**, 227–39 (2005).
34. Zehn, D., Lee, S. Y. & Bevan, M. J. Complete but curtailed T-cell response to very low-affinity antigen. *Nature* **458**, 211–4 (2009).
35. Yu, W. *et al.* Clonal Deletion Prunes but Does Not Eliminate Self-Specific $\alpha\beta$ CD8(+) T

- Lymphocytes. *Immunity* **42**, 929–41 (2015).
36. Maeda, Y. *et al.* Detection of self-reactive CD8⁺ T cells with an anergic phenotype in healthy individuals. *Science* **346**, 1536–40 (2014).
 37. Danke, N. A., Koelle, D. M., Yee, C., Beheray, S. & Kwok, W. W. Autoreactive T cells in healthy individuals. *J. Immunol.* **172**, 5967–72 (2004).
 38. Tsokos, G. C. Systemic lupus erythematosus. *N. Engl. J. Med.* **365**, 2110–21 (2011).
 39. Vantourout, P. & Hayday, A. Six-of-the-best: unique contributions of $\gamma\delta$ T cells to immunology. *Nat. Rev. Immunol.* **13**, 88–100 (2013).
 40. Takada, K. *et al.* TCR affinity for thymoproteasome-dependent positively selecting peptides conditions antigen responsiveness in CD8(+) T cells. *Nat. Immunol.* **16**, 1069–76 (2015).
 41. Murata, S. *et al.* Regulation of CD8⁺ T cell development by thymus-specific proteasomes. *Science* **316**, 1349–53 (2007).
 42. Egawa, T. & Littman, D. R. ThPOK acts late in specification of the helper T cell lineage and suppresses Runx-mediated commitment to the cytotoxic T cell lineage. *Nat. Immunol.* **9**, 1131–9 (2008).
 43. Žuklys, S. *et al.* Foxn1 regulates key target genes essential for T cell development in postnatal thymic epithelial cells. *Nat. Immunol.* **17**, 1206–15 (2016).
 44. Stritesky, G. L. *et al.* Murine thymic selection quantified using a unique method to capture deleted T cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **110**, 4679–84 (2013).
 45. Nishijima, H. *et al.* Ectopic Aire Expression in the Thymic Cortex Reveals Inherent Properties of Aire as a Tolerogenic Factor within the Medulla. *J. Immunol.* **195**, 4641–9 (2015).
 46. Daley, S. R., Hu, D. Y. & Goodnow, C. C. Helios marks strongly autoreactive CD4⁺ T cells in two major waves of thymic deletion distinguished by induction of PD-1 or NF- κ B. *J. Exp. Med.* **210**, 269–85 (2013).
 47. Kreslavsky, T. *et al.* Negative selection, not receptor editing, is a physiological response of autoreactive thymocytes. *J. Exp. Med.* **210**, 1911–8 (2013).
 48. Koay, H.-F. *et al.* A three-stage intrathymic development pathway for the mucosal-associated invariant T cell lineage. *Nat. Immunol.* **17**, 1300–11 (2016).
 49. Moran, A. E. *et al.* T cell receptor signal strength in Treg and iNKT cell development demonstrated by a novel fluorescent reporter mouse. *J. Exp. Med.* **208**, 1279–89 (2011).
 50. McDonald, B. D., Bunker, J. J., Ishizuka, I. E., Jabri, B. & Bendelac, A. Elevated T cell receptor signaling identifies a thymic precursor to the TCR $\alpha\beta$ (+)CD4(-)CD8 β (-) intraepithelial lymphocyte lineage. *Immunity* **41**, 219–29 (2014).
 51. Mayans, S. *et al.* $\alpha\beta$ T cell receptors expressed by CD4(-)CD8 $\alpha\beta$ (-) intraepithelial T cells drive their fate into a unique lineage with unusual MHC reactivities. *Immunity* **41**, 207–

- 18 (2014).
52. Stritesky, G. L., Jameson, S. C. & Hogquist, K. A. Selection of Self-Reactive T Cells in the Thymus. *Annu. Rev. Immunol.* **30**, 95–114 (2012).
53. Park, J.-H. *et al.* Signaling by intrathymic cytokines, not T cell antigen receptors, specifies CD8 lineage choice and promotes the differentiation of cytotoxic-lineage T cells. *Nat. Immunol.* **11**, 257–64 (2010).
54. Bautista, J. L. *et al.* Intracloal competition limits the fate determination of regulatory T cells in the thymus. *Nat. Immunol.* **10**, 610–7 (2009).
55. Li, H. *et al.* IL-23 promotes TCR-mediated negative selection of thymocytes through the upregulation of IL-23 receptor and ROR γ t. *Nat. Commun.* **5**, 4259 (2014).
56. Weist, B. M., Kurd, N., Boussier, J., Chan, S. W. & Robey, E. A. Thymic regulatory T cell niche size is dictated by limiting IL-2 from antigen-bearing dendritic cells and feedback competition. *Nat. Immunol.* **16**, 635–41 (2015).
57. Anderson, M. S. *et al.* Projection of an immunological self shadow within the thymus by the aire protein. *Science* **298**, 1395–401 (2002).
58. Takaba, H. *et al.* Fezf2 Orchestrates a Thymic Program of Self-Antigen Expression for Immune Tolerance. *Cell* **163**, 975–87 (2015).
59. Perera, J. *et al.* Self-Antigen-Driven Thymic B Cell Class Switching Promotes T Cell Central Tolerance. *Cell Rep.* **17**, 387–98 (2016).
60. Gardner, J. M. *et al.* Deletional tolerance mediated by extrathymic Aire-expressing cells. *Science* **321**, 843–7 (2008).
61. Yamano, T. *et al.* Thymic B Cells Are Licensed to Present Self Antigens for Central T Cell Tolerance Induction. *Immunity* **42**, 1048–61 (2015).
62. Proietto, A. I. *et al.* Dendritic cells in the thymus contribute to T-regulatory cell induction. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **105**, 19869–74 (2008).
63. Hubert, F.-X. *et al.* Aire regulates the transfer of antigen from mTECs to dendritic cells for induction of thymic tolerance. *Blood* **118**, 2462–72 (2011).
64. Perry, J. S. A. *et al.* Distinct Contributions of Aire and Antigen-Presenting-Cell Subsets to the Generation of Self-Tolerance in the Thymus. *Immunity* **41**, 414–26 (2014).
65. Meredith, M., Zemmour, D., Mathis, D. & Benoist, C. Aire controls gene expression in the thymic epithelium with ordered stochasticity. *Nat. Immunol.* **16**, 942–9 (2015).
66. Yano, M. *et al.* Aire controls the differentiation program of thymic epithelial cells in the medulla for the establishment of self-tolerance. *J. Exp. Med.* **205**, 2827–38 (2008).
67. Uddin, M. M. *et al.* Foxn1- β 5t transcriptional axis controls CD8(+) T-cell production in the thymus. *Nat. Commun.* **8**, 14419 (2017).
68. Ripen, A. M., Nitta, T., Murata, S., Tanaka, K. & Takahama, Y. Ontogeny of thymic cortical epithelial cells expressing the thymoproteasome subunit β 5t. *Eur. J. Immunol.* **41**, 1278–87 (2011).

69. Malhotra, D. *et al.* Tolerance is established in polyclonal CD4(+) T cells by distinct mechanisms, according to self-peptide expression patterns. *Nat. Immunol.* **17**, 187–95 (2016).
70. Kurts, C. *et al.* CD8 T cell ignorance or tolerance to islet antigens depends on antigen dose. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **96**, 12703–7 (1999).
71. Schietinger, A. & Greenberg, P. D. Tolerance and exhaustion: defining mechanisms of T cell dysfunction. *Trends Immunol.* **35**, 51–60 (2014).
72. Mueller, D. L. Mechanisms maintaining peripheral tolerance. *Nat. Immunol.* **11**, 21–7 (2010).
73. Redmond, W. L. & Sherman, L. A. Peripheral tolerance of CD8 T lymphocytes. *Immunity* **22**, 275–84 (2005).
74. Kim, H.-J. *et al.* Stable inhibitory activity of regulatory T cells requires the transcription factor Helios. *Science* **350**, 334–9 (2015).
75. Richards, D. M. *et al.* The Contained Self-Reactive Peripheral T Cell Repertoire: Size, Diversity, and Cellular Composition. *J. Immunol.* **195**, 2067–79 (2015).
76. Kurts, C., Heath, W. R., Kosaka, H., Miller, J. F. & Carbone, F. R. The peripheral deletion of autoreactive CD8+ T cells induced by cross-presentation of self-antigens involves signaling through CD95 (Fas, Apo-1). *J. Exp. Med.* **188**, 415–20 (1998).
77. Davey, G. M. *et al.* Peripheral deletion of autoreactive CD8 T cells by cross presentation of self-antigen occurs by a Bcl-2-inhibitable pathway mediated by Bim. *J. Exp. Med.* **196**, 947–55 (2002).
78. Kurts, C., Kosaka, H., Carbone, F. R., Miller, J. F. & Heath, W. R. Class I-restricted cross-presentation of exogenous self-antigens leads to deletion of autoreactive CD8(+) T cells. *J. Exp. Med.* **186**, 239–45 (1997).
79. Mayerova, D., Parke, E. A., Bursch, L. S., Odumade, O. A. & Hogquist, K. A. Langerhans cells activate naive self-antigen-specific CD8 T cells in the steady state. *Immunity* **21**, 391–400 (2004).
80. Fathman, C. G. & Lineberry, N. B. Molecular mechanisms of CD4+ T-cell anergy. *Nat. Rev. Immunol.* **7**, 599–609 (2007).
81. Schietinger, A., Delrow, J. J., Basom, R. S., Blattman, J. N. & Greenberg, P. D. Rescued tolerant CD8 T cells are preprogrammed to reestablish the tolerant state. *Science* **335**, 723–7 (2012).
82. Ohlén, C. *et al.* CD8(+) T cell tolerance to a tumor-associated antigen is maintained at the level of expansion rather than effector function. *J. Exp. Med.* **195**, 1407–18 (2002).
83. Attanasio, J. & Wherry, E. J. Costimulatory and Coinhibitory Receptor Pathways in Infectious Disease. *Immunity* **44**, 1052–68 (2016).
84. Zhang, Q. & Vignali, D. A. A. Co-stimulatory and Co-inhibitory Pathways in Autoimmunity. *Immunity* **44**, 1034–51 (2016).

85. Blackburn, S. D. *et al.* Coregulation of CD8⁺ T cell exhaustion by multiple inhibitory receptors during chronic viral infection. *Nat. Immunol.* **10**, 29–37 (2009).
86. Sakuishi, K. *et al.* Targeting Tim-3 and PD-1 pathways to reverse T cell exhaustion and restore anti-tumor immunity. *J. Exp. Med.* **207**, 2187–94 (2010).
87. Waterhouse, P. *et al.* Lymphoproliferative disorders with early lethality in mice deficient in Ctla-4. *Science* **270**, 985–8 (1995).
88. Nishimura, H., Nose, M., Hiai, H., Minato, N. & Honjo, T. Development of lupus-like autoimmune diseases by disruption of the PD-1 gene encoding an ITIM motif-carrying immunoreceptor. *Immunity* **11**, 141–51 (1999).
89. Pauken, K. E. *et al.* Cutting edge: identification of autoreactive CD4⁺ and CD8⁺ T cell subsets resistant to PD-1 pathway blockade. *J. Immunol.* **194**, 3551–5 (2015).
90. Fife, B. T. *et al.* Interactions between PD-1 and PD-L1 promote tolerance by blocking the TCR-induced stop signal. *Nat. Immunol.* **10**, 1185–92 (2009).
91. Patsoukis, N., Sari, D. & Boussiotis, V. A. PD-1 inhibits T cell proliferation by upregulating p27 and p15 and suppressing Cdc25A. *Cell Cycle* **11**, 4305–9 (2012).
92. Parry, R. V. *et al.* CTLA-4 and PD-1 Receptors Inhibit T-Cell Activation by Distinct Mechanisms. *Mol. Cell. Biol.* **25**, 9543–53 (2005).
93. Yokosuka, T. *et al.* Programmed cell death 1 forms negative costimulatory microclusters that directly inhibit T cell receptor signaling by recruiting phosphatase SHP2. *J. Exp. Med.* **209**, 1201–17 (2012).
94. McKinney, E. F., Lee, J. C., Jayne, D. R. W., Lyons, P. A. & Smith, K. G. C. T-cell exhaustion, co-stimulation and clinical outcome in autoimmunity and infection. *Nature* **523**, 612–6 (2015).
95. Beura, L. K. *et al.* Normalizing the environment recapitulates adult human immune traits in laboratory mice. *Nature* **532**, 512–6 (2016).
96. Hogquist, K. A. *et al.* T cell receptor antagonist peptides induce positive selection. *Cell* **76**, 17–27 (1994).
97. Rocha, B. & von Boehmer, H. Peripheral selection of the T cell repertoire. *Science* **251**, 1225–8 (1991).
98. Baldwin, T. A., Sandau, M. M., Jameson, S. C. & Hogquist, K. A. The timing of TCR alpha expression critically influences T cell development and selection. *J. Exp. Med.* **202**, 111–21 (2005).
99. Egawa, T., Kreslavsky, T., Littman, D. R. & von Boehmer, H. Lineage diversion of T cell receptor transgenic thymocytes revealed by lineage fate mapping. *PLoS One* **3**, e1512 (2008).
100. Zikherman, J., Parameswaran, R. & Weiss, A. Endogenous antigen tunes the responsiveness of naive B cells but not T cells. *Nature* **489**, 160–4 (2012).
101. Feau, S. *et al.* The CD4⁺ T-cell help signal is transmitted from APC to CD8⁺ T-cells via

- CD27–CD70 interactions. *Nat. Commun.* **3**, 948 (2012).
102. Bursch, L. S., Rich, B. E. & Hogquist, K. A. Langerhans cells are not required for the CD8 T cell response to epidermal self-antigens. *J. Immunol.* **182**, 4657–64 (2009).
 103. McGargill, M. A. *et al.* A spontaneous CD8 T cell-dependent autoimmune disease to an antigen expressed under the human keratin 14 promoter. *J. Immunol.* **169**, 2141–7 (2002).
 104. Miyagawa, F., Okiyama, N., Villarroel, V. & Katz, S. I. Identification of CD3(+)CD4(-)CD8(-) T Cells as Potential Regulatory Cells in an Experimental Murine Model of Graft-Versus-Host Skin Disease (GVHD). *J. Invest. Dermatol.* **133**, 2538–45 (2013).
 105. Enouz, S., Carrié, L., Merkler, D., Bevan, M. J. & Zehn, D. Autoreactive T cells bypass negative selection and respond to self-antigen stimulation during infection. *J. Exp. Med.* **209**, 1769–79 (2012).
 106. Wherry, E. J. *et al.* Molecular signature of CD8+ T cell exhaustion during chronic viral infection. *Immunity* **27**, 670–84 (2007).
 107. Horai, R. *et al.* Microbiota-Dependent Activation of an Autoreactive T Cell Receptor Provokes Autoimmunity in an Immunologically Privileged Site. *Immunity* **43**, 343–53 (2015).
 108. Ivanov, I. I. *et al.* Induction of Intestinal Th17 Cells by Segmented Filamentous Bacteria. *Cell* **139**, 485–98 (2009).
 109. Lander, E. S. The Heroes of CRISPR. *Cell* **164**, 18–28 (2016).
 110. Swat, W., Shinkai, Y., Cheng, H. L., Davidson, L. & Alt, F. W. Activated Ras signals differentiation and expansion of CD4+8+ thymocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **93**, 4683–7 (1996).
 111. Strasser, A., Harris, A. W. & Cory, S. bcl-2 transgene inhibits T cell death and perturbs thymic self-censorship. *Cell* **67**, 889–99 (1991).
 112. Lee, Y. *et al.* Induction and molecular signature of pathogenic TH17 cells. *Nat. Immunol.* **13**, 991–9 (2012).
 113. Sherlock, J. P. *et al.* IL-23 induces spondyloarthritis by acting on ROR-γt+ CD3+CD4-CD8- enthesal resident T cells. *Nat. Med.* **18**, 1069–76 (2012).
 114. Altman, J. D. *et al.* Phenotypic analysis of antigen-specific T lymphocytes. *Science* **274**, 94–6 (1996).
 115. Huang, J. *et al.* Detection, phenotyping, and quantification of antigen-specific T cells using a peptide-MHC dodecamer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **113**, E1890–7 (2016).
 116. Reantragoon, R. *et al.* Antigen-loaded MR1 tetramers define T cell receptor heterogeneity in mucosal-associated invariant T cells. *J. Exp. Med.* **210**, 2305–20 (2013).
 117. Uchtenhagen, H. *et al.* Efficient ex vivo analysis of CD4+ T-cell responses using combinatorial HLA class II tetramer staining. *Nat. Commun.* **7**, 12614 (2016).

118. Lee, P. P. *et al.* Characterization of circulating T cells specific for tumor-associated antigens in melanoma patients. *Nat. Med.* **5**, 677–85 (1999).
119. Agudo, J. *et al.* GFP-specific CD8 T cells enable targeted cell depletion and visualization of T-cell interactions. *Nat. Biotechnol.* **33**, 1287–92 (2015).
120. Artyomov, M. N., Lis, M., Devadas, S., Davis, M. M. & Chakraborty, A. K. CD4 and CD8 binding to MHC molecules primarily acts to enhance Lck delivery. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **107**, 16916–21 (2010).
121. Van Laethem, F. *et al.* Lck availability during thymic selection determines the recognition specificity of the T cell repertoire. *Cell* **154**, 1326–41 (2013).
122. Van Laethem, F. *et al.* Deletion of CD4 and CD8 coreceptors permits generation of alphabetaT cells that recognize antigens independently of the MHC. *Immunity* **27**, 735–50 (2007).
123. Tikhonova, A. N. *et al.* $\alpha\beta$ T cell receptors that do not undergo major histocompatibility complex-specific thymic selection possess antibody-like recognition specificities. *Immunity* **36**, 79–91 (2012).
124. Cheroutre, H. & Lambolez, F. Doubting the TCR Coreceptor Function of CD8 $\alpha\alpha$. *Immunity* **28**, 149–59 (2008).
125. Laugel, B. *et al.* The multiple roles of the CD8 coreceptor in T cell biology: opportunities for the selective modulation of self-reactive cytotoxic T cells. *J. Leukoc. Biol.* **90**, 1089–99 (2011).
126. Reis, B. S., Rogoz, A., Costa-Pinto, F. A., Taniuchi, I. & Mucida, D. Mutual expression of the transcription factors Runx3 and ThPOK regulates intestinal CD4⁺ T cell immunity. *Nat. Immunol.* **14**, 271–80 (2013).
127. Yamagata, T., Mathis, D. & Benoist, C. Self-reactivity in thymic double-positive cells commits cells to a CD8 alpha alpha lineage with characteristics of innate immune cells. *Nat. Immunol.* **5**, 597–605 (2004).
128. Liu, B. *et al.* 2D TCR-pMHC-CD8 kinetics determines T-cell responses in a self-antigen-specific TCR system. *Eur. J. Immunol.* **44**, 239–50 (2014).
129. Jiang, N. *et al.* Two-stage cooperative T cell receptor-peptide major histocompatibility complex-CD8 trimolecular interactions amplify antigen discrimination. *Immunity* **34**, 13–23 (2011).
130. Gibbings, D. & Befus, A. D. CD4 and CD8: an inside-out coreceptor model for innate immune cells. *J. Leukoc. Biol.* **86**, 251–9 (2009).
131. Stone, J. D., Chervin, A. S. & Kranz, D. M. T-cell receptor binding affinities and kinetics: impact on T-cell activity and specificity. *Immunology* **126**, 165–76 (2009).
132. Holler, P. D. & Kranz, D. M. Quantitative analysis of the contribution of TCR/pepMHC affinity and CD8 to T cell activation. *Immunity* **18**, 255–64 (2003).
133. Kerry, S. E. *et al.* Interplay between TCR affinity and necessity of coreceptor ligation: high-affinity peptide-MHC/TCR interaction overcomes lack of CD8 engagement. *J.*

- Immunol.* **171**, 4493–503 (2003).
134. Chervin, A. S. *et al.* The impact of TCR-binding properties and antigen presentation format on T cell responsiveness. *J. Immunol.* **183**, 1166–78 (2009).
 135. Cawthon, A. G., Lu, H. & Alexander-Miller, M. A. Peptide requirement for CTL activation reflects the sensitivity to CD3 engagement: correlation with CD8alphabeta versus CD8alphaalpha expression. *J. Immunol.* **167**, 2577–84 (2001).
 136. van Oers, N. S. *et al.* CD8 inhibits signal transduction through the T cell receptor in CD4-CD8- thymocytes from T cell receptor transgenic mice reconstituted with a transgenic CD8 alpha molecule. *J. Immunol.* **151**, 777–90 (1993).
 137. Bosselut, R. *et al.* Association of the adaptor molecule LAT with CD4 and CD8 coreceptors identifies a new coreceptor function in T cell receptor signal transduction. *J. Exp. Med.* **190**, 1517–26 (1999).
 138. Bosselut, R. *et al.* Role of CD8beta domains in CD8 coreceptor function: importance for MHC I binding, signaling, and positive selection of CD8+ T cells in the thymus. *Immunity* **12**, 409–18 (2000).
 139. Cawthon, A. G. & Alexander-Miller, M. A. Optimal colocalization of TCR and CD8 as a novel mechanism for the control of functional avidity. *J. Immunol.* **169**, 3492–8 (2002).
 140. Arcaro, A. *et al.* CD8beta endows CD8 with efficient coreceptor function by coupling T cell receptor/CD3 to raft-associated CD8/p56(lck) complexes. *J. Exp. Med.* **194**, 1485–95 (2001).
 141. Irie, H. Y. *et al.* The cytoplasmic domain of CD8 beta regulates Lck kinase activation and CD8 T cell development. *J. Immunol.* **161**, 183–91 (1998).
 142. Pang, D. J., Hayday, A. C. & Bijlmakers, M.-J. CD8 Raft localization is induced by its assembly into CD8alpha beta heterodimers, Not CD8alpha alpha homodimers. *J. Biol. Chem.* **282**, 13884–94 (2007).
 143. Veillette, A., Bookman, M. A., Horak, E. M. & Bolen, J. B. The CD4 and CD8 T cell surface antigens are associated with the internal membrane tyrosine-protein kinase p56lck. *Cell* **55**, 301–8 (1988).
 144. Weiss, A. Human LAT mutation results in immune deficiency and autoimmunity but also raises questions about signaling pathways. *J. Exp. Med.* **213**, 1114 (2016).
 145. Su, X. *et al.* Phase separation of signaling molecules promotes T cell receptor signal transduction. *Science* **352**, 595–9 (2016).
 146. Daniels, M. A. *et al.* CD8 binding to MHC class I molecules is influenced by T cell maturation and glycosylation. *Immunity* **15**, 1051–61 (2001).
 147. Park, J.-H. *et al.* 'Coreceptor tuning': cytokine signals transcriptionally tailor CD8 coreceptor expression to the self-specificity of the TCR. *Nat. Immunol.* **8**, 1049–59 (2007).
 148. Kieper, W. C., Burghardt, J. T. & Surh, C. D. A role for TCR affinity in regulating naive T cell homeostasis. *J. Immunol.* **172**, 40–4 (2004).

149. Pestano, G. A. *et al.* Inactivation of misselected CD8 T cells by CD8 gene methylation and cell death. *Science* **284**, 1187–91 (1999).
150. Takada, K. & Jameson, S. C. Self-class I MHC molecules support survival of naive CD8 T cells, but depress their functional sensitivity through regulation of CD8 expression levels. *J. Exp. Med.* **206**, 2253–69 (2009).
151. Kimura, M. Y. *et al.* IL-7 signaling must be intermittent, not continuous, during CD8⁺ T cell homeostasis to promote cell survival instead of cell death. *Nat. Immunol.* **14**, 143–51 (2013).
152. Wijesundara, D. K., Jackson, R. J., Tschärke, D. C. & Ranasinghe, C. IL-4 and IL-13 mediated down-regulation of CD8 expression levels can dampen anti-viral CD8⁺ T cell avidity following HIV-1 recombinant pox viral vaccination. *Vaccine* **31**, 4548–55 (2013).
153. Erard, F., Wild, M. T., Garcia-Sanz, J. A. & Le Gros, G. Switch of CD8 T cells to noncytolytic CD8-CD4⁺ cells that make TH2 cytokines and help B cells. *Science* **260**, 1802–5 (1993).
154. Harland, K. L. *et al.* Epigenetic plasticity of Cd8a locus during CD8⁺ T-cell development and effector differentiation and reprogramming. *Nat. Commun.* **5**, 301–8 (2014).
155. Apte, S. H., Baz, A., Groves, P., Kelso, A. & Kienzle, N. Interferon-gamma and interleukin-4 reciprocally regulate CD8 expression in CD8⁺ T cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **105**, 17475–80 (2008).
156. Xiao, Z., Mescher, M. F. & Jameson, S. C. Detuning CD8 T cells: down-regulation of CD8 expression, tetramer binding, and response during CTL activation. *J. Exp. Med.* **204**, 2667–77 (2007).
157. Kao, C., Daniels, M. A. & Jameson, S. C. Loss of CD8 and TCR binding to Class I MHC ligands following T cell activation. *Int. Immunol.* **17**, 1607–17 (2005).
158. Taniuchi, I. & Ellmeier, W. Transcriptional and epigenetic regulation of CD4/CD8 lineage choice. *Adv. Immunol.* **110**, 71–110 (2011).
159. Hassan, H. *et al.* Cd8 enhancer E8I and Runx factors regulate CD8 α expression in activated CD8⁺ T cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **108**, 18330–5 (2011).
160. Ellmeier, W., Haust, L. & Tschisnarov, R. Transcriptional control of CD4 and CD8 coreceptor expression during T cell development. *Cell. Mol. Life Sci.* **70**, 4537–53 (2013).
161. Newman, D. M. *et al.* Acetylation of the Cd8 Locus by KAT6A Determines Memory T Cell Diversity. *Cell Rep.* **16**, 3311–21 (2016).
162. Chandele, A. & Kaech, S. M. Cutting edge: memory CD8 T cell maturation occurs independently of CD8 α expression. *J. Immunol.* **175**, 5619–23 (2005).
163. Feng, Y. & Rudensky, A. Y. DNA methylation secures CD4(+) and CD8(+) T cell lineage borders. *Nat. Immunol.* **16**, 681–3 (2015).
164. Carbone, A. M., Marrack, P. & Kappler, J. W. Demethylated CD8 gene in CD4⁺ T cells suggests that CD4⁺ cells develop from CD8⁺ precursors. *Science* **242**, 1174–6 (1988).

165. Bilic, I. *et al.* Negative regulation of CD8 expression via Cd8 enhancer-mediated recruitment of the zinc finger protein MAZR. *Nat. Immunol.* **7**, 392–400 (2006).
166. Boucheron, N. *et al.* CD4(+) T cell lineage integrity is controlled by the histone deacetylases HDAC1 and HDAC2. *Nat. Immunol.* **15**, 439–48 (2014).
167. Hedrich, C. M. & Tsokos, G. C. Epigenetic mechanisms in systemic lupus erythematosus and other autoimmune diseases. *Trends Mol. Med.* **17**, 714–24 (2011).
168. Jenkinson, S. R. *et al.* Expression of the transcription factor cKrox in peripheral CD8 T cells reveals substantial postthymic plasticity in CD4-CD8 lineage differentiation. *J. Exp. Med.* **204**, 267–72 (2007).
169. Steinke, F. C. *et al.* TCF-1 and LEF-1 act upstream of Th-POK to promote the CD4(+) T cell fate and interact with Runx3 to silence Cd4 in CD8(+) T cells. *Nat. Immunol.* **15**, 646–56 (2014).
170. Xing, S. *et al.* Tcf1 and Lef1 transcription factors establish CD8(+) T cell identity through intrinsic HDAC activity. *Nat. Immunol.* **17**, 695–703 (2016).
171. Sakaguchi, S. *et al.* MAZR and Runx Factors Synergistically Repress ThPOK during CD8+ T Cell Lineage Development. *J. Immunol.* **195**, 2879–87 (2015).
172. Nie, H., Yao, X., Maika, S. D. & Tucker, P. W. SATB1 is required for CD8 coreceptor reversal. *Mol. Immunol.* **46**, 207–11 (2008).
173. Zhang, S. *et al.* Antigen-specific clonal expansion and cytolytic effector function of CD8+ T lymphocytes depend on the transcription factor Bcl11b. *J. Exp. Med.* **207**, 1687–99 (2010).
174. Hedrich, C. M. *et al.* CAMP responsive element modulator (CREM) α mediates chromatin remodeling of CD8 during the generation of CD3+CD4-CD8- T cells. *J. Biol. Chem.* **289**, 2361–70 (2014).
175. Hedrich, C. M. *et al.* cAMP-responsive element modulator α (CREM α) trans-represses the transmembrane glycoprotein CD8 and contributes to the generation of CD3+CD4-CD8- T cells in health and disease. *J. Biol. Chem.* **288**, 31880–7 (2013).
176. Dashtsoodol, N. *et al.* Alternative pathway for the development of V α 14+ NKT cells directly from CD4-CD8- thymocytes that bypasses the CD4+CD8+ stage. *Nat. Immunol.* **18**, 274–82 (2017).
177. Bendelac, A., Savage, P. B. & Teyton, L. The biology of NKT cells. *Annu. Rev. Immunol.* **25**, 297–336 (2007).
178. Mori, L., Lepore, M. & De Libero, G. The Immunology of CD1- and MR1-Restricted T Cells. *Annu. Rev. Immunol.* **34**, 479–510 (2016).
179. Meierovics, A., Yankelevich, W.-J. C. & Cowley, S. C. MAIT cells are critical for optimal mucosal immune responses during in vivo pulmonary bacterial infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **110**, E3119-28 (2013).
180. Smiley, S. T. *et al.* Exacerbated susceptibility to infection-stimulated immunopathology in CD1d-deficient mice. *J. Immunol.* **174**, 7904–11 (2005).

181. Exley, M. A. *et al.* CD1d-reactive T-cell activation leads to amelioration of disease caused by diabetogenic encephalomyocarditis virus. *J. Leukoc. Biol.* **69**, 713–8 (2001).
182. Nieuwenhuis, E. E. S. *et al.* CD1d-dependent macrophage-mediated clearance of *Pseudomonas aeruginosa* from lung. *Nat. Med.* **8**, 588–93 (2002).
183. Cui, J. *et al.* Requirement for Valpha14 NKT cells in IL-12-mediated rejection of tumors. *Science* **278**, 1623–6 (1997).
184. Hong, C. *et al.* CD4+ T cells in the absence of the CD8+ cytotoxic T cells are critical and sufficient for NKT cell-dependent tumor rejection. *J. Immunol.* **177**, 6747–57 (2006).
185. Huang, L. & Crispe, I. N. Distinctive selection mechanisms govern the T cell receptor repertoire of peripheral CD4-CD8- alpha/beta T cells. *J. Exp. Med.* **176**, 699–706 (1992).
186. Landolfi, M. M. *et al.* CD2-CD4-CD8- lymph node T lymphocytes in MRL lpr/lpr mice are derived from a CD2+CD4+CD8+ thymic precursor. *J. Immunol.* **151**, 1086–96 (1993).
187. Ford, M. S., Zhang, Z.-X., Chen, W. & Zhang, L. Double-negative T regulatory cells can develop outside the thymus and do not mature from CD8+ T cell precursors. *J. Immunol.* **177**, 2803–9 (2006).
188. Kadena, T. *et al.* TCR alpha beta+ CD4- CD8- T cells differentiate extrathymically in an lck-independent manner and participate in early response against *Listeria monocytogenes* infection through interferon-gamma production. *Immunology* **91**, 511–9 (1997).
189. Cheng, L., Dejbakhsh-Jones, S., Liblau, R., Zeng, D. & Strober, S. Different patterns of TCR transgene expression in single-positive and double-negative T cells. Evidence for separate pathways of T cell maturation. *J. Immunol.* **156**, 3591–601 (1996).
190. Guy-Grand, D. *et al.* Extrathymic T cell lymphopoiesis: ontogeny and contribution to gut intraepithelial lymphocytes in athymic and euthymic mice. *J. Exp. Med.* **197**, 333–41 (2003).
191. Fusco, A. *et al.* Molecular evidence for a thymus-independent partial T cell development in a FOXP1-/- athymic human fetus. *PLoS One* **8**, e81786 (2013).
192. McClory, S. *et al.* Evidence for a stepwise program of extrathymic T cell development within the human tonsil. *J. Clin. Invest.* **122**, 1403–15 (2012).
193. Albuquerque, A. S. *et al.* Human FOXP1-Deficiency Is Associated with $\alpha\beta$ Double-Negative and FoxP3+ T-Cell Expansions That Are Distinctly Modulated upon Thymic Transplantation. *PLoS One* **7**, e37042 (2012).
194. Neyt, K., GeurtsvanKessel, C. H. & Lambrecht, B. N. Double-negative T resident memory cells of the lung react to influenza virus infection via CD11c(hi) dendritic cells. *Mucosal Immunol.* **9**, 999–1014 (2016).
195. Rocha, B., von Boehmer, H. & Guy-Grand, D. Selection of intraepithelial lymphocytes with CD8 alpha/alpha co-receptors by self-antigen in the murine gut. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **89**, 5336–40 (1992).
196. Martina, M. N., Noel, S., Saxena, A., Rabb, H. & Hamad, A. R. A. Double negative (DN)

- $\alpha\beta$ T cells: misperception and overdue recognition. *Immunol. Cell Biol.* **93**, 305–10 (2015).
197. Crispín, J. C. & Tsokos, G. C. Human TCR- $\alpha\beta$ ⁺ CD4⁺ CD8⁺ T cells can derive from CD8⁺ T cells and display an inflammatory effector phenotype. *J. Immunol.* **183**, 4675–81 (2009).
 198. Zhang, D. *et al.* New differentiation pathway for double-negative regulatory T cells that regulates the magnitude of immune responses. *Blood* **109**, 4071–9 (2007).
 199. Brady, H. J., Pennington, D. J., Miles, C. G. & Dzierzak, E. A. CD4 cell surface downregulation in HIV-1 Nef transgenic mice is a consequence of intracellular sequestration. *EMBO J.* **12**, 4923–32 (1993).
 200. Stone, J. D. *et al.* Opposite effects of endogenous peptide-MHC class I on T cell activity in the presence and absence of CD8. *J. Immunol.* **186**, 5193–200 (2011).
 201. Marodon, G., Warren, D., Filomio, M. C. & Posnett, D. N. Productive infection of double-negative T cells with HIV in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **96**, 11958–63 (1999).
 202. Singleterry, W. L., Henderson, H. & Cruse, J. M. Depletion of pro-inflammatory CD161⁺ double negative (CD3⁺)CD4⁺CD8⁺ T cells in AIDS patients is ameliorated by expansion of the $\gamma\delta$ T cell population. *Exp. Mol. Pathol.* **92**, 155–9 (2012).
 203. DeMaster, L. K. *et al.* A Subset of CD4/CD8 Double-Negative T Cells Expresses HIV Proteins in Patients on Antiretroviral Therapy. *J. Virol.* **90**, 2165–79 (2015).
 204. Grishkan, I. V., Ntranos, A., Calabresi, P. A. & Gocke, A. R. Helper T cells down-regulate CD4 expression upon chronic stimulation giving rise to double-negative T cells. *Cell. Immunol.* **284**, 68–74 (2013).
 205. Hamad, A. R. *et al.* Lack of coreceptor allows survival of chronically stimulated double-negative $\alpha\beta$ T cells: implications for autoimmunity. *J. Exp. Med.* **193**, 1113–21 (2001).
 206. Mou, Z. *et al.* MHC class II restricted innate-like double negative T cells contribute to optimal primary and secondary immunity to *Leishmania major*. *PLoS Pathog.* **10**, e1004396 (2014).
 207. Zhao, X. *et al.* A novel differentiation pathway from CD4⁺ T cells to CD4⁺ T cells for maintaining immune system homeostasis. *Cell Death Dis.* **7**, e2193 (2016).
 208. Chang, J. T. *et al.* Asymmetric T lymphocyte division in the initiation of adaptive immune responses. *Science* **315**, 1687–91 (2007).
 209. Trimble, L. A., Prince, K. A., Pestano, G. A., Daley, J. & Cantor, H. Fas-dependent elimination of nonselected CD8 cells and *lpr* disease. *J. Immunol.* **168**, 4960–7 (2002).
 210. Schönrich, G. *et al.* Down-regulation of T cell receptors on self-reactive T cells as a novel mechanism for extrathymic tolerance induction. *Cell* **65**, 293–304 (1991).
 211. Mamalaki, C. *et al.* Tolerance in TCR/cognate antigen double-transgenic mice mediated by incomplete thymic deletion and peripheral receptor downregulation. *Dev. Immunol.* **4**, 299–315 (1996).

212. Dillon, S. R., MacKay, V. L. & Fink, P. J. A functionally compromised intermediate in extrathymic CD8⁺ T cell deletion. *Immunity* **3**, 321–33 (1995).
213. Blish, C. A., Dillon, S. R., Farr, A. G. & Fink, P. J. Anergic CD8⁺ T cells can persist and function in vivo. *J. Immunol.* **163**, 155–64 (1999).
214. Rocha, B., Tanchot, C. & Von Boehmer, H. Clonal anergy blocks in vivo growth of mature T cells and can be reversed in the absence of antigen. *J. Exp. Med.* **177**, 1517–21 (1993).
215. Rocha, B., Grandien, A. & Freitas, A. A. Anergy and exhaustion are independent mechanisms of peripheral T cell tolerance. *J. Exp. Med.* **181**, 993–1003 (1995).
216. Maile, R. *et al.* Low-avidity CD8^{lo} T cells induced by incomplete antigen stimulation in vivo regulate naive higher avidity CD8^{hi} T cell responses to the same antigen. *Eur. J. Immunol.* **36**, 397–410 (2006).
217. Mehal, W. Z. & Crispe, I. N. TCR ligation on CD8⁺ T cells creates double-negative cells in vivo. *J. Immunol.* **161**, 1686–93 (1998).
218. Merino, R. *et al.* Effect of long-term anti-CD4 or anti-CD8 treatment on the development of lpr CD4⁻ CD8⁻ double negative T cells and of the autoimmune syndrome in MRL-lpr/lpr mice. *J. Autoimmun.* **8**, 33–45 (1995).
219. Ohteki, T., Iwamoto, M., Izui, S. & MacDonald, H. R. Reduced development of CD4⁻ B220⁺ T cells but normal autoantibody production in lpr/lpr mice lacking major histocompatibility complex class I molecules. *Eur. J. Immunol.* **25**, 37–41 (1995).
220. Bleesing, J. J. *et al.* TcR-alpha/beta(+) CD4(-)CD8(-) T cells in humans with the autoimmune lymphoproliferative syndrome express a novel CD45 isoform that is analogous to murine B220 and represents a marker of altered O-glycan biosynthesis. *Clin. Immunol.* **100**, 314–24 (2001).
221. Völkl, S. *et al.* Hyperactive mTOR pathway promotes lymphoproliferation and abnormal differentiation in autoimmune lymphoproliferative syndrome. *Blood* **128**, 227–38 (2016).
222. Kakkanaiah, V. N., Nagarkatti, M. & Nagarkatti, P. S. Evidence for the existence of distinct heterogeneity among the peripheral CD4⁻CD8⁻ T cells from MRL-lpr/lpr mice based on the expression of the J11d marker, activation requirements, and functional properties. *Cell. Immunol.* **127**, 442–57 (1990).
223. Maldonado, M. A., Eisenberg, R. A., Roper, E., Cohen, P. L. & Kotzin, B. L. Greatly reduced lymphoproliferation in lpr mice lacking major histocompatibility complex class I. *J. Exp. Med.* **181**, 641–8 (1995).
224. Giese, T. & Davidson, W. F. In CD8⁺ T cell-deficient lpr/lpr mice, CD4⁺B220⁺ and CD4⁺B220⁻ T cells replace B220⁺ double-negative T cells as the predominant populations in enlarged lymph nodes. *J. Immunol.* **154**, 4986–95 (1995).
225. Giese, T. & Davidson, W. F. Chronic treatment of C3H-lpr/lpr and C3H-gld/gld mice with anti-CD8 monoclonal antibody prevents the accumulation of double negative T cells but not autoantibody production. *J. Immunol.* **152**, 2000–10 (1994).

226. Mohamood, A. S. *et al.* Fas-mediated apoptosis regulates the composition of peripheral alphabeta T cell repertoire by constitutively purging out double negative T cells. *PLoS One* **3**, e3465 (2008).
227. Gonzalez-Quintial, R. *et al.* Systemic autoimmunity and lymphoproliferation are associated with excess IL-7 and inhibited by IL-7R α blockade. *PLoS One* **6**, e27528 (2011).
228. Boyman, O., Létourneau, S., Krieg, C. & Sprent, J. Homeostatic proliferation and survival of naïve and memory T cells. *Eur. J. Immunol.* **39**, 2088–94 (2009).
229. Mackall, C. L., Fry, T. J. & Gress, R. E. Harnessing the biology of IL-7 for therapeutic application. *Nat. Rev. Immunol.* **11**, 330–42 (2011).
230. Bristeau-Leprince, A. *et al.* Human TCR alpha/beta+ CD4-CD8- double-negative T cells in patients with autoimmune lymphoproliferative syndrome express restricted Vbeta TCR diversity and are clonally related to CD8+ T cells. *J. Immunol.* **181**, 440–8 (2008).
231. Dillon, C. P. *et al.* RIPK1 blocks early postnatal lethality mediated by caspase-8 and RIPK3. *Cell* **157**, 1189–202 (2014).
232. Renno, T. *et al.* Expression of B220 on activated T cell blasts precedes apoptosis. *Eur. J. Immunol.* **28**, 540–7 (1998).
233. Renno, T., Hahne, M., Tschopp, J. & MacDonald, H. R. Peripheral T cells undergoing superantigen-induced apoptosis in vivo express B220 and upregulate Fas and Fas ligand. *J. Exp. Med.* **183**, 431–7 (1996).
234. Oka, S., Mori, N., Matsuyama, S., Takamori, Y. & Kubo, K. Presence of B220 within thymocytes and its expression on the cell surface during apoptosis. *Immunology* **100**, 417–23 (2000).
235. Bouillet, P. *et al.* Proapoptotic Bcl-2 relative Bim required for certain apoptotic responses, leukocyte homeostasis, and to preclude autoimmunity. *Science* **286**, 1735–8 (1999).
236. Hao, Z., Hampel, B., Yagita, H. & Rajewsky, K. T cell-specific ablation of Fas leads to Fas ligand-mediated lymphocyte depletion and inflammatory pulmonary fibrosis. *J. Exp. Med.* **199**, 1355–65 (2004).
237. Stranges, P. B. *et al.* Elimination of antigen-presenting cells and autoreactive T cells by Fas contributes to prevention of autoimmunity. *Immunity* **26**, 629–41 (2007).
238. Carow, B., Gao, Y., Coquet, J., Reilly, M. & Rottenberg, M. E. Ick-Driven Cre Expression Alters T Cell Development in the Thymus and the Frequencies and Functions of Peripheral T Cell Subsets. *J. Immunol.* **197**, 2261–8 (2016).
239. Cruz, A. C. *et al.* Fas/CD95 prevents autoimmunity independently of lipid raft localization and efficient apoptosis induction. *Nat. Commun.* **7**, 13895 (2016).
240. Klebanoff, C. A. *et al.* Memory T cell-driven differentiation of naive cells impairs adoptive immunotherapy. *J. Clin. Invest.* **126**, 318–34 (2016).
241. Sun, M., Ames, K. T., Suzuki, I. & Fink, P. J. The cytoplasmic domain of Fas ligand

- costimulates TCR signals. *J. Immunol.* **177**, 1481–91 (2006).
242. Suzuki, I., Martin, S., Boursalian, T. E., Beers, C. & Fink, P. J. Fas ligand costimulates the in vivo proliferation of CD8⁺ T cells. *J. Immunol.* **165**, 5537–43 (2000).
243. Suzuki, I. & Fink, P. J. Maximal proliferation of cytotoxic T lymphocytes requires reverse signaling through Fas ligand. *J. Exp. Med.* **187**, 123–8 (1998).
244. Strober, S. *et al.* Double negative (CD4-CD8- α β +) T cells which promote tolerance induction and regulate autoimmunity. *Immunol. Rev.* **149**, 217–30 (1996).
245. Juvet, S. C. & Zhang, L. Double negative regulatory T cells in transplantation and autoimmunity: recent progress and future directions. *J. Mol. Cell Biol.* **4**, 48–58 (2012).
246. Hillhouse, E. E. & Lesage, S. A comprehensive review of the phenotype and function of antigen-specific immunoregulatory double negative T cells. *J. Autoimmun.* **40**, 58–65 (2013).
247. Bruley-Rosset, M., Miconnet, I., Canon, C. & Halle-Pannenko, O. Mls^a generated suppressor cells. I. Suppression is mediated by double-negative (CD3⁺CD5⁺CD4-CD8-) α / β T cell receptor-bearing cells. *J. Immunol.* **145**, 4046–52 (1990).
248. Zhang, Z. X., Yang, L., Young, K. J., DuTemple, B. & Zhang, L. Identification of a previously unknown antigen-specific regulatory T cell and its mechanism of suppression. *Nat. Med.* **6**, 782–9 (2000).
249. Young, K. J., Yang, L., Phillips, M. J. & Zhang, L. Donor-lymphocyte infusion induces transplantation tolerance by activating systemic and graft-infiltrating double-negative regulatory T cells. *Blood* **100**, 3408–14 (2002).
250. Hillhouse, E. E., Beauchamp, C., Chabot-Roy, G., Dugas, V. & Lesage, S. Interleukin-10 limits the expansion of immunoregulatory CD4-CD8- T cells in autoimmune-prone non-obese diabetic mice. *Immunol. Cell Biol.* **88**, 771–80 (2010).
251. Priatel, J. J., Utting, O. & Teh, H. S. TCR/self-antigen interactions drive double-negative T cell peripheral expansion and differentiation into suppressor cells. *J. Immunol.* **167**, 6188–94 (2001).
252. Dugas, V. *et al.* Unusual selection and peripheral homeostasis for immunoregulatory CD4(-) CD8(-) T cells. *Immunology* **139**, 129–39 (2013).
253. Chen, W. *et al.* Donor lymphocyte infusion induces long-term donor-specific cardiac xenograft survival through activation of recipient double-negative regulatory T cells. *J. Immunol.* **175**, 3409–16 (2005).
254. Barwig, C. *et al.* Antigen dose-dependent suppression of murine IgE responses is mediated by CD4-CD8- double-negative T cells. *Clin. Exp. Allergy* **40**, 891–901 (2010).
255. Rharbaoui, F. *et al.* Characterization of a B220⁺ lymphoid cell subpopulation with immune modulatory functions in nasal-associated lymphoid tissues. *J. Immunol.* **174**, 1317–24 (2005).
256. Duncan, B. *et al.* Double negative (CD3⁺ 4- 8-) TCR $\alpha\beta$ splenic cells from young NOD mice provide long-lasting protection against type 1 diabetes. *PLoS One* **5**, e11427

- (2010).
257. Liu, T. *et al.* Combination of double negative T cells and anti-thymocyte serum reverses type 1 diabetes in NOD mice. *J. Transl. Med.* **14**, 57 (2016).
 258. Ford, M. S. *et al.* Peptide-activated double-negative T cells can prevent autoimmune type-1 diabetes development. *Eur. J. Immunol.* **37**, 2234–41 (2007).
 259. Martina, M. N. *et al.* Double-Negative $\alpha\beta$ T Cells Are Early Responders to AKI and Are Found in Human Kidney. *J. Am. Soc. Nephrol.* **27**, 1113–23 (2016).
 260. McIver, Z. *et al.* Double-negative regulatory T cells induce allotolerance when expanded after allogeneic haematopoietic stem cell transplantation. *Br. J. Haematol.* **141**, 170–8 (2008).
 261. Voelkl, S. *et al.* Characterization of MHC class-I restricted TCR $\alpha\beta$ CD4⁺ CD8⁺ double negative T cells recognizing the gp100 antigen from a melanoma patient after gp100 vaccination. *Cancer Immunol. Immunother.* **58**, 709–18 (2009).
 262. Lee, B. P.-L. *et al.* Expression profiling of murine double-negative regulatory T cells suggest mechanisms for prolonged cardiac allograft survival. *J. Immunol.* **174**, 4535–44 (2005).
 263. Thomson, C. W. *et al.* FcR gamma presence in TCR complex of double-negative T cells is critical for their regulatory function. *J. Immunol.* **177**, 2250–7 (2006).
 264. Zhang, Z.-X., Stanford, W. L. & Zhang, L. Ly-6A is critical for the function of double negative regulatory T cells. *Eur. J. Immunol.* **32**, 1584–92 (2002).
 265. Juvet, S. C. *et al.* Autocrine IFN γ controls the regulatory function of lymphoproliferative double negative T cells. *PLoS One* **7**, e47732 (2012).
 266. Cong, M. *et al.* Interleukin-2 Enhances the Regulatory Functions of CD4(+) T Cell-Derived CD4(-)CD8(-) Double Negative T Cells. *J. Interferon Cytokine Res.* **36**, 499–505 (2016).
 267. Allgäuer, A. *et al.* IL-7 Abrogates the Immunosuppressive Function of Human Double-Negative T Cells by Activating Akt/mTOR Signaling. *J. Immunol.* **195**, 3139–48 (2015).
 268. Lee, B. P.-L. *et al.* CXCR5/CXCL13 interaction is important for double-negative regulatory T cell homing to cardiac allografts. *J. Immunol.* **176**, 5276–83 (2006).
 269. Ford McIntyre, M. S., Gao, J. F., Li, X., Naeini, B. M. & Zhang, L. Consequences of double negative regulatory T cell and antigen presenting cell interaction on immune response suppression. *Int. Immunopharmacol.* **11**, 597–603 (2011).
 270. Zhang, Z.-X. *et al.* Double-negative T cells, activated by xenoantigen, lyse autologous B and T cells using a perforin/granzyme-dependent, Fas-Fas ligand-independent pathway. *J. Immunol.* **177**, 6920–9 (2006).
 271. Ford, M. S., Young, K. J., Zhang, Z., Ohashi, P. S. & Zhang, L. The immune regulatory function of lymphoproliferative double negative T cells in vitro and in vivo. *J. Exp. Med.* **196**, 261–7 (2002).
 272. Gao, J. F. *et al.* Regulation of antigen-expressing dendritic cells by double negative

- p regulatory T cells.
- Eur. J. Immunol.*
- 41**
- , 2699–708 (2011).
273. Ford McIntyre, M. S., Young, K. J., Gao, J., Joe, B. & Zhang, L. Cutting edge: in vivo trogocytosis as a mechanism of double negative regulatory T cell-mediated antigen-specific suppression. *J. Immunol.* **181**, 2271–5 (2008).
 274. Zhang, Z.-X. *et al.* Adoptive transfer of DNT cells induces long-term cardiac allograft survival and augments recipient CD4(+)Foxp3(+) Treg cell accumulation. *Transpl. Immunol.* **24**, 119–26 (2011).
 275. Ma, Y. *et al.* Adoptive transfer of double negative T regulatory cells induces B-cell death in vivo and alters rejection pattern of rat-to-mouse heart transplantation. *Xenotransplantation* **15**, 56–63 (2008).
 276. Su, Y. *et al.* Double negative Treg cells promote nonmyeloablative bone marrow chimerism by inducing T-cell clonal deletion and suppressing NK cell function. *Eur. J. Immunol.* **42**, 1216–25 (2012).
 277. Dugas, V. *et al.* Idd13 is involved in determining immunoregulatory DN T-cell number in NOD mice. *Genes Immun.* **15**, 82–7 (2014).
 278. Szymczak-Workman, A. L., Delgoffe, G. M., Green, D. R. & Vignali, D. A. A. Cutting edge: regulatory T cells do not mediate suppression via programmed cell death pathways. *J. Immunol.* **187**, 4416–20 (2011).
 279. Buckner, J. H. Mechanisms of impaired regulation by CD4(+)CD25(+)FOXP3(+) regulatory T cells in human autoimmune diseases. *Nat. Rev. Immunol.* **10**, 849–59 (2010).
 280. Crispín, J. C. *et al.* Expanded double negative T cells in patients with systemic lupus erythematosus produce IL-17 and infiltrate the kidneys. *J. Immunol.* **181**, 8761–6 (2008).
 281. Rioll-Blanco, L. *et al.* IL-23 receptor regulates unconventional IL-17-producing T cells that control bacterial infections. *J. Immunol.* **184**, 1710–20 (2010).
 282. Lai, Z.-W. *et al.* Mechanistic target of rapamycin activation triggers IL-4 production and necrotic death of double-negative T cells in patients with systemic lupus erythematosus. *J. Immunol.* **191**, 2236–46 (2013).
 283. Dean, G. S., Anand, A., Blofeld, A., Isenberg, D. A. & Lydyard, P. M. Characterization of CD3+ CD4- CD8- (double negative) T cells in patients with systemic lupus erythematosus: production of IL-4. *Lupus* **11**, 501–7 (2002).
 284. Hedrich, C. M. *et al.* Stat3 promotes IL-10 expression in lupus T cells through trans-activation and chromatin remodeling. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **111**, 13457–62 (2014).
 285. Renauer, P. A., Coit, P. & Sawalha, A. H. The DNA methylation signature of human TCRαβ+CD4-CD8- double negative T cells reveals CG demethylation and a unique epigenetic architecture permissive to a broad stimulatory immune response. *Clin. Immunol.* **156**, 19–27 (2015).

286. Rensing-Ehl, A. *et al.* Abnormally differentiated CD4⁺ or CD8⁺ T cells with phenotypic and genetic features of double negative T cells in human Fas deficiency. *Blood* **124**, 851–60 (2014).
287. Hammond, D. M. *et al.* Double-negative T cells from MRL-lpr/lpr mice mediate cytolytic activity when triggered through adhesion molecules and constitutively express perforin gene. *J. Exp. Med.* **178**, 2225–30 (1993).
288. Shivakumar, S., Tsokos, G. C. & Datta, S. K. T cell receptor alpha/beta expressing double-negative (CD4⁻/CD8⁻) and CD4⁺ T helper cells in humans augment the production of pathogenic anti-DNA autoantibodies associated with lupus nephritis. *J. Immunol.* **143**, 103–12 (1989).
289. Sainis, K. & Datta, S. K. CD4⁺ T cell lines with selective patterns of autoreactivity as well as CD4⁻ CD8⁻ T helper cell lines augment the production of idiotypes shared by pathogenic anti-DNA autoantibodies in the NZB x SWR model of lupus nephritis. *J. Immunol.* **140**, 2215–24 (1988).
290. Villani, F. N. A. *et al.* Trypanosoma cruzi-induced activation of functionally distinct $\alpha\beta$ and $\gamma\delta$ CD4⁻ CD8⁻ T cells in individuals with polar forms of Chagas' disease. *Infect. Immun.* **78**, 4421–30 (2010).
291. Cowley, S. C. & Elkins, K. L. Multiple T cell subsets control Francisella tularensis LVS intracellular growth without stimulation through macrophage interferon gamma receptors. *J. Exp. Med.* **198**, 379–89 (2003).
292. Cowley, S. C., Meierovics, A. I., Frelinger, J. A., Iwakura, Y. & Elkins, K. L. Lung CD4-CD8⁻ double-negative T cells are prominent producers of IL-17A and IFN-gamma during primary respiratory murine infection with Francisella tularensis live vaccine strain. *J. Immunol.* **184**, 5791–801 (2010).
293. Prins, R. M. *et al.* Characterization of defective CD4-CD8⁻ T cells in murine tumors generated independent of antigen specificity. *J. Immunol.* **172**, 1602–11 (2004).
294. Ling, E., Shubinsky, G. & Press, J. Increased proportion of CD3⁺CD4⁻CD8⁻ double-negative T cells in peripheral blood of children with Behcet's disease. *Autoimmun. Rev.* **6**, 237–40 (2007).
295. Zahran, A. M., Saad, K., Elsayh, K. I. & Alblihed, M. A. Characterization of circulating CD4⁽⁺⁾ CD8⁽⁺⁾ double positive and CD4⁽⁻⁾ CD8⁽⁻⁾ double negative T-lymphocyte in children with β -thalassemia major. *Int. J. Hematol.* **105**, 265–71 (2016).
296. Alunno, A. *et al.* IL-17-producing CD4-CD8⁻ T cells are expanded in the peripheral blood, infiltrate salivary glands and are resistant to corticosteroids in patients with primary Sjogren's syndrome. *Ann. Rheum. Dis.* **72**, 286–92 (2013).
297. Tarbox, J. A. *et al.* Elevated double negative T cells in pediatric autoimmunity. *J. Clin. Immunol.* **34**, 594–9 (2014).
298. Sakamoto, A. *et al.* T cell receptor V beta repertoire of double-negative alpha/beta T cells in patients with systemic sclerosis. *Arthritis Rheum.* **35**, 944–8 (1992).
299. Zhang, Z., Kytтары, V. C. & Tsokos, G. C. The role of IL-23/IL-17 axis in lupus nephritis. *J.*

- Immunol.* **183**, 3160–9 (2009).
300. Ascon, D. B. *et al.* Normal mouse kidneys contain activated and CD3+CD4- CD8- double-negative T lymphocytes with a distinct TCR repertoire. *J. Leukoc. Biol.* **84**, 1400–9 (2008).
301. Abstracts of ICI 2016 International Congress of Immunology, 21–26 August 2016, Melbourne, Australia. *Eur. J. Immunol.* **46 Suppl 1**, 1–1238 (2016).
302. Ueyama, A. *et al.* Potential role of IL-17-producing CD4/CD8 double negative $\alpha\beta$ T cells in psoriatic skin inflammation in a TPA-induced STAT3C transgenic mouse model. *J. Dermatol. Sci.* **85**, 27–35 (2016).
303. Maione, F. *et al.* Analysis of the inflammatory response in HY-TCR transgenic mice highlights the pathogenic potential of CD4- CD8- T cells. *Autoimmunity* **43**, 672–81 (2010).
304. Liu, M. F. *et al.* Distribution of double-negative (CD4- CD8-, DN) T subsets in blood and synovial fluid from patients with rheumatoid arthritis. *Clin. Rheumatol.* **18**, 227–31 (1999).
305. Wang, J. *et al.* Inhibition of SHP2 ameliorates the pathogenesis of systemic lupus erythematosus. *J. Clin. Invest.* **126**, 2077–92 (2016).
306. Mizui, M. *et al.* IL-2 protects lupus-prone mice from multiple end-organ damage by limiting CD4-CD8- IL-17-producing T cells. *J. Immunol.* **193**, 2168–77 (2014).
307. Otomo, K. *et al.* Cutting Edge: Nanogel-Based Delivery of an Inhibitor of CaMK4 to CD4+ T Cells Suppresses Experimental Autoimmune Encephalomyelitis and Lupus-like Disease in Mice. *J. Immunol.* **195**, 5533–7 (2015).
308. Suárez-Fueyo, A. *et al.* Inhibition of PI3K δ reduces kidney infiltration by macrophages and ameliorates systemic lupus in the mouse. *J. Immunol.* **193**, 544–54 (2014).
309. Jonsson, C. A., Erlandsson, M., Svensson, L., Mölne, J. & Carlsten, H. Mycophenolate mofetil ameliorates perivascular T lymphocyte inflammation and reduces the double-negative T cell population in SLE-prone MRLlpr/lpr mice. *Cell. Immunol.* **197**, 136–44 (1999).
310. Kyttaris, V. C., Zhang, Z., Kuchroo, V. K., Oukka, M. & Tsokos, G. C. Cutting edge: IL-23 receptor deficiency prevents the development of lupus nephritis in C57BL/6-lpr/lpr mice. *J. Immunol.* **184**, 4605–9 (2010).
311. von Boehmer, H., Kirberg, J. & Rocha, B. An unusual lineage of alpha/beta T cells that contains autoreactive cells. *J. Exp. Med.* **174**, 1001–8 (1991).
312. Chen, Y. C., Ye, Y. L. & Chiang, B. L. Establishment and characterization of cloned CD4-CD8- alphabeta-T cell receptor (TCR)-bearing autoreactive T cells from autoimmune NZB x NZW F1 mice. *Clin. Exp. Immunol.* **108**, 52–7 (1997).
313. Martínez, C. *et al.* Functional double-negative T cells in the periphery express T cell receptor V beta gene products that cause deletion of single-positive T cells. *Eur. J. Immunol.* **23**, 250–4 (1993).

314. Li, Z. *et al.* Composition and variation analysis of TCR β -chain CDR3 repertoire in the thymus and spleen of MRL/lpr mouse at different ages. *Immunogenetics* **67**, 25–37 (2015).
315. Ban, L. *et al.* Selective death of autoreactive T cells in human diabetes by TNF or TNF receptor 2 agonism. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **105**, 13644–9 (2008).
316. Coppieters, K. T. *et al.* Demonstration of islet-autoreactive CD8 T cells in insulitic lesions from recent onset and long-term type 1 diabetes patients. *J. Exp. Med.* **209**, 51–60 (2012).
317. Moogk, D. *et al.* Constitutive Lck Activity Drives Sensitivity Differences between CD8+ Memory T Cell Subsets. *J. Immunol.* **197**, 644–54 (2016).
318. Schilham, M. W. *et al.* Alloreactive cytotoxic T cells can develop and function in mice lacking both CD4 and CD8. *Eur. J. Immunol.* **23**, 1299–304 (1993).
319. Casas, J. *et al.* Ligand-engaged TCR is triggered by Lck not associated with CD8 coreceptor. *Nat. Commun.* **5**, 5624 (2014).
320. Moulton, V. R. & Tsokos, G. C. T cell signaling abnormalities contribute to aberrant immune cell function and autoimmunity. *J. Clin. Invest.* **125**, 2220–7 (2015).
321. Balomenos, D., Rumold, R. & Theofilopoulos, A. N. The proliferative in vivo activities of lpr double-negative T cells and the primary role of p59fyn in their activation and expansion. *J. Immunol.* **159**, 2265–73 (1997).
322. Kyttaris, V. C., Zhang, Z., Kampagianni, O. & Tsokos, G. C. Calcium signaling in systemic lupus erythematosus T cells: a treatment target. *Arthritis Rheum.* **63**, 2058–66 (2011).
323. Buskiewicz, I. A. *et al.* Reactive oxygen species induce virus-independent MAVS oligomerization in systemic lupus erythematosus. *Sci. Signal.* **9**, ra115 (2016).
324. Gergely, P. *et al.* Persistent mitochondrial hyperpolarization, increased reactive oxygen intermediate production, and cytoplasmic alkalization characterize altered IL-10 signaling in patients with systemic lupus erythematosus. *J. Immunol.* **169**, 1092–101 (2002).
325. Sena, L. A. *et al.* Mitochondria are required for antigen-specific T cell activation through reactive oxygen species signaling. *Immunity* **38**, 225–36 (2013).
326. Teachey, D. T. *et al.* Targeting Notch signaling in autoimmune and lymphoproliferative disease. *Blood* **111**, 705–14 (2008).
327. Guy, C. S. *et al.* Distinct TCR signaling pathways drive proliferation and cytokine production in T cells. *Nat. Immunol.* **14**, 262–70 (2013).
328. Kurebayashi, Y. *et al.* PI3K-Akt-mTORC1-S6K1/2 Axis Controls Th17 Differentiation by Regulating Gfi1 Expression and Nuclear Translocation of ROR γ . *Cell Rep.* **1**, 360–73 (2012).
329. Kato, H. & Perl, A. Mechanistic target of rapamycin complex 1 expands Th17 and IL-4+ CD4-CD8- double-negative T cells and contracts regulatory T cells in systemic lupus erythematosus. *J. Immunol.* **192**, 4134–44 (2014).

- 330. Teachey, D. T. *et al.* Rapamycin improves lymphoproliferative disease in murine autoimmune lymphoproliferative syndrome (ALPS). *Blood* **108**, 1965–71 (2006).
- 331. Kinjyo, I. *et al.* Cutting edge: Lymphoproliferation caused by Fas deficiency is dependent on the transcription factor eomesodermin. *J. Immunol.* **185**, 7151–5 (2010).
- 332. Daszkiewicz, L. *et al.* Distinct p21 requirements for regulating normal and self-reactive T cells through IFN- γ production. *Sci. Rep.* **5**, 7691 (2015).
- 333. Xiao, S., Sung, S.-S. J., Fu, S. M. & Ju, S.-T. Combining Fas mutation with interleukin-2 deficiency prevents Colitis and Lupus: implicating interleukin-2 for auto-reactive T cell expansion and Fas ligand for colon epithelial cell death. *J. Biol. Chem.* **278**, 52730–8 (2003).
- 334. Boggio, E. *et al.* IL-17 protects T cells from apoptosis and contributes to development of ALPS-like phenotypes. *Blood* **123**, 1178–86 (2014).
- 335. Kis-Toth, K. *et al.* Selective Loss of Signaling Lymphocytic Activation Molecule Family Member 4-Positive CD8⁺ T Cells Contributes to the Decreased Cytotoxic Cell Activity in Systemic Lupus Erythematosus. *Arthritis Rheumatol. (Hoboken, N.J.)* **68**, 164–73 (2016).
- 336. Wiener, A. *et al.* CXCR5 is critically involved in progression of lupus through regulation of B cell and double-negative T cell trafficking. *Clin. Exp. Immunol.* **185**, 22–32 (2016).
- 337. Giese, T., Allison, J. P. & Davidson, W. F. Functionally anergic lpr and gld B220⁺ T cell receptor (TCR)- α/β ⁺ double-negative T cells express CD28 and respond to costimulation with phorbol myristate acetate and antibodies to CD28 and the TCR. *J. Immunol.* **151**, 597–609 (1993).
- 338. Sieling, P. A. *et al.* Human double-negative T cells in systemic lupus erythematosus provide help for IgG and are restricted by CD1c. *J. Immunol.* **165**, 5338–44 (2000).
- 339. Lui, J. B., Devarajan, P., Teplicki, S. A. & Chen, Z. Cross-differentiation from the CD8 lineage to CD4 T cells in the gut-associated microenvironment with a nonessential role of microbiota. *Cell Rep.* **10**, 574–85 (2015).
- 340. Park, Y., Moon, S.-J. & Lee, S.-W. Lineage re-commitment of CD4CD8 $\alpha\alpha$ intraepithelial lymphocytes in the gut. *BMB Rep.* **49**, 11–7 (2016).
- 341. Sujino, T. *et al.* Tissue adaptation of regulatory and intraepithelial CD4⁺ T cells controls gut inflammation. *Science* **352**, 1581–6 (2016).
- 342. Koehli, S., Naeher, D., Galati-Fournier, V., Zehn, D. & Palmer, E. Optimal T-cell receptor affinity for inducing autoimmunity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **111**, 17248–53 (2014).
- 343. Fulton, R. B. *et al.* The TCR's sensitivity to self peptide-MHC dictates the ability of naive CD8(+) T cells to respond to foreign antigens. *Nat. Immunol.* **16**, 107–17 (2015).
- 344. Ge, Q., Bai, A., Jones, B., Eisen, H. N. & Chen, J. Competition for self-peptide-MHC complexes and cytokines between naive and memory CD8⁺ T cells expressing the same or different T cell receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **101**, 3041–6 (2004).
- 345. McDonald, B. D., Bunker, J. J., Erickson, S. A., Oh-Hora, M. & Bendelac, A. Crossreactive

- $\alpha\beta$ T Cell Receptors Are the Predominant Targets of Thymocyte Negative Selection. *Immunity* **43**, 859–69 (2015).
346. Fritsch, M., Andersson, A., Petersson, K. & Ivars, F. A TCR alpha chain transgene induces maturation of CD4- CD8- alpha beta+ T cells from gamma delta T cell precursors. *Eur. J. Immunol.* **28**, 828–37 (1998).
 347. Jiang, T. T. *et al.* Programmed Death-1 Culls Peripheral Accumulation of High-Affinity Autoreactive CD4 T Cells to Protect against Autoimmunity. *Cell Rep.* **17**, 1783–1794 (2016).
 348. Schuldt, N. J., Auger, J. L., Hogquist, K. A. & Binstadt, B. A. Bi-Allelic TCR α or β Recombination Enhances T Cell Development but Is Dispensable for Antigen Responses and Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. *PLoS One* **10**, e0145762 (2015).
 349. Gavin, M. A. & Rudensky, A. Y. Dual TCR T cells: gaining entry into the periphery. *Nat. Immunol.* **3**, 109–10 (2002).
 350. Hale, J. S., Ames, K. T., Boursalian, T. E. & Fink, P. J. Cutting Edge: Rag Deletion in Peripheral T Cells Blocks TCR Revision. *J. Immunol.* **184**, 5964–8 (2010).
 351. Bansal, K., Yoshida, H., Benoist, C. & Mathis, D. The transcriptional regulator Aire binds to and activates super-enhancers. *Nat. Immunol.* **18**, 263–73 (2017).
 352. Ross, E. M., Bourges, D., Hogan, T. V, Gleeson, P. A. & van Driel, I. R. Helios defines T cells being driven to tolerance in the periphery and thymus. *Eur. J. Immunol.* **44**, 2048–58 (2014).
 353. Akimova, T., Beier, U. H., Wang, L., Levine, M. H. & Hancock, W. W. Helios expression is a marker of T cell activation and proliferation. *PLoS One* **6**, e24226 (2011).
 354. Crawford, A. *et al.* Molecular and transcriptional basis of CD4⁺ T cell dysfunction during chronic infection. *Immunity* **40**, 289–302 (2014).
 355. Gerner, M. Y., Heltemes-Harris, L. M., Fife, B. T. & Mescher, M. F. Cutting edge: IL-12 and type I IFN differentially program CD8 T cells for programmed death 1 re-expression levels and tumor control. *J. Immunol.* **191**, 1011–5 (2013).
 356. Austin, J. W., Lu, P., Majumder, P., Ahmed, R. & Boss, J. M. STAT3, STAT4, NFATc1, and CTCF regulate PD-1 through multiple novel regulatory regions in murine T cells. *J. Immunol.* **192**, 4876–86 (2014).
 357. Terawaki, S. *et al.* IFN- α directly promotes programmed cell death-1 transcription and limits the duration of T cell-mediated immunity. *J. Immunol.* **186**, 2772–9 (2011).
 358. Kinter, A. L. *et al.* The common gamma-chain cytokines IL-2, IL-7, IL-15, and IL-21 induce the expression of programmed death-1 and its ligands. *J. Immunol.* **181**, 6738–46 (2008).
 359. Baas, M. *et al.* TGF β -dependent expression of PD-1 and PD-L1 controls CD8(+) T cell anergy in transplant tolerance. *Elife* **5**, e08133 (2016).
 360. Casey, K. A. *et al.* Antigen-independent differentiation and maintenance of effector-like resident memory T cells in tissues. *J. Immunol.* **188**, 4866–75 (2012).

361. Martin, B. *et al.* Highly self-reactive naive CD4 T cells are prone to differentiate into regulatory T cells. *Nat. Commun.* **4**, 2209 (2013).
362. Mandl, J. N., Monteiro, J. P., Vrisekoop, N. & Germain, R. N. T cell-positive selection uses self-ligand binding strength to optimize repertoire recognition of foreign antigens. *Immunity* **38**, 263–74 (2013).
363. Henderson, J. G., Opejin, A., Jones, A., Gross, C. & Hawiger, D. CD5 instructs extrathymic regulatory T cell development in response to self and tolerizing antigens. *Immunity* **42**, 471–83 (2015).
364. Domingues, R. G. *et al.* CD5 expression is regulated during human T-cell activation by alternative polyadenylation, PTBP1, and miR-204. *Eur. J. Immunol.* **46**, 1490–503 (2016).
365. Potter, T. A., Rajan, T. V., Dick, R. F. & Bluestone, J. A. Substitution at residue 227 of H-2 class I molecules abrogates recognition by CD8-dependent, but not CD8-independent, cytotoxic T lymphocytes. *Nature* **337**, 73–5 (1989).
366. Purbhoo, M. A., Irvine, D. J., Huppa, J. B. & Davis, M. M. T cell killing does not require the formation of a stable mature immunological synapse. *Nat. Immunol.* **5**, 524–30 (2004).
367. Daniels, M. A. & Jameson, S. C. Critical role for CD8 in T cell receptor binding and activation by peptide/major histocompatibility complex multimers. *J. Exp. Med.* **191**, 335–46 (2000).
368. Kurts, C. *et al.* Constitutive class I-restricted exogenous presentation of self antigens in vivo. *J. Exp. Med.* **184**, 923–30 (1996).
369. Kurts, C., Miller, J. F., Subramaniam, R. M., Carbone, F. R. & Heath, W. R. Major histocompatibility complex class I-restricted cross-presentation is biased towards high dose antigens and those released during cellular destruction. *J. Exp. Med.* **188**, 409–14 (1998).
370. Wang, L. *et al.* Langerin expressing cells promote skin immune responses under defined conditions. *J. Immunol.* **180**, 4722–7 (2008).
371. Barber, D. L. *et al.* Restoring function in exhausted CD8 T cells during chronic viral infection. *Nature* **439**, 682–7 (2006).
372. Thornton, A. M. *et al.* Expression of Helios, an Ikaros transcription factor family member, differentiates thymic-derived from peripherally induced Foxp3⁺ T regulatory cells. *J. Immunol.* **184**, 3433–41 (2010).
373. Sugimoto, N. *et al.* Foxp3-dependent and -independent molecules specific for CD25⁺CD4⁺ natural regulatory T cells revealed by DNA microarray analysis. *Int. Immunol.* **18**, 1197–209 (2006).
374. Gottschalk, R. A., Corse, E. & Allison, J. P. Expression of Helios in Peripherally Induced Foxp3⁺ Regulatory T Cells. *J. Immunol.* **188**, 976–80 (2012).
375. Himmel, M. E., MacDonald, K. G., Garcia, R. V., Steiner, T. S. & Levings, M. K. Helios+

- and Helios- Cells Coexist within the Natural FOXP3+ T Regulatory Cell Subset in Humans. *J. Immunol.* **190**, 2001–8 (2013).
376. Nakagawa, H. *et al.* Instability of Helios-deficient Tregs is associated with conversion to a T-effector phenotype and enhanced antitumor immunity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **113**, 6248–53 (2016).
 377. Sebastian, M. *et al.* Helios Controls a Limited Subset of Regulatory T Cell Functions. *J. Immunol.* **196**, 144–55 (2016).
 378. Narni-Mancinelli, E. *et al.* Tuning of Natural Killer Cell Reactivity by NKp46 and Helios Calibrates T Cell Responses. *Science* **335**, 344–8 (2012).
 379. Dovat, S. *et al.* Transgenic expression of Helios in B lineage cells alters B cell properties and promotes lymphomagenesis. *J. Immunol.* **175**, 3508–15 (2005).
 380. Baine, I., Basu, S., Ames, R., Sellers, R. S. & Macian, F. Helios Induces Epigenetic Silencing of Il2 Gene Expression in Regulatory T Cells. *J. Immunol.* **190**, 1008–1016 (2013).
 381. Tabayashi, T. *et al.* Characterization of the short isoform of Helios overexpressed in patients with T-cell malignancies. *Cancer Sci.* **98**, 182–8 (2007).
 382. Zhao, S. *et al.* Alternative Splice Variants Modulates Dominant-Negative Function of Helios in T-Cell Leukemia. *PLoS One* **11**, e0163328 (2016).
 383. Cai, Q., Dierich, A., Oulad-Abdelghani, M., Chan, S. & Kastner, P. Helios Deficiency Has Minimal Impact on T Cell Development and Function. *J. Immunol.* **183**, 2303–11 (2009).
 384. Serre, K. *et al.* Helios Is Associated with CD4 T Cells Differentiating to T Helper 2 and Follicular Helper T Cells In Vivo Independently of Foxp3 Expression. *PLoS One* **6**, e20731 (2011).
 385. Keir, M. E., Freeman, G. J. & Sharpe, A. H. PD-1 regulates self-reactive CD8+ T cell responses to antigen in lymph nodes and tissues. *J. Immunol.* **179**, 5064–70 (2007).
 386. Francisco, L. M., Sage, P. T. & Sharpe, A. H. The PD-1 pathway in tolerance and autoimmunity. *Immunol. Rev.* **236**, 219–42 (2010).
 387. Chemnitz, J. M., Parry, R. V., Nichols, K. E., June, C. H. & Riley, J. L. SHP-1 and SHP-2 Associate with Immunoreceptor Tyrosine-Based Switch Motif of Programmed Death 1 upon Primary Human T Cell Stimulation, but Only Receptor Ligation Prevents T Cell Activation. *J. Immunol.* **173**, 945–54 (2004).
 388. Staron, M. M. *et al.* The transcription factor FoxO1 sustains expression of the inhibitory receptor PD-1 and survival of antiviral CD8(+) T cells during chronic infection. *Immunity* **41**, 802–14 (2014).
 389. Patsoukis, N., Li, L., Sari, D., Petkova, V. & Boussiotis, V. A. PD-1 increases PTEN phosphatase activity while decreasing PTEN protein stability by inhibiting casein kinase 2. *Mol. Cell. Biol.* **33**, 3091–8 (2013).
 390. Bengsch, B. *et al.* Bioenergetic Insufficiencies Due to Metabolic Alterations Regulated by the Inhibitory Receptor PD-1 Are an Early Driver of CD8+ T Cell Exhaustion. *Immunity*

- 45**, 358–373 (2016).
391. Patsoukis, N. *et al.* PD-1 alters T-cell metabolic reprogramming by inhibiting glycolysis and promoting lipolysis and fatty acid oxidation. *Nat. Commun.* **6**, 6692 (2015).
 392. Honda, T. *et al.* Tuning of Antigen Sensitivity by T Cell Receptor-Dependent Negative Feedback Controls T Cell Effector Function in Inflamed Tissues. *Immunity* **40**, 235–47 (2014).
 393. Im, S. J. *et al.* Defining CD8⁺ T cells that provide the proliferative burst after PD-1 therapy. *Nature* **537**, 417–21 (2016).
 394. Patsoukis, N. *et al.* Selective Effects of PD-1 on Akt and Ras Pathways Regulate Molecular Components of the Cell Cycle and Inhibit T Cell Proliferation. *Sci. Signal.* **5**, ra46 (2012).
 395. Fan, X. & Rudensky, A. Y. Hallmarks of Tissue-Resident Lymphocytes. *Cell* **164**, 1198–211 (2016).
 396. Groh, V., Fabbi, M., Hochstenbach, F., Maziarsz, R. T. & Strominger, J. L. Double-negative (CD4-CD8-) lymphocytes bearing T-cell receptor alpha and beta chains in normal human skin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **86**, 5059–63 (1989).
 397. Butcher, E. C. & Picker, L. J. Lymphocyte homing and homeostasis. *Science* **272**, 60–6 (1996).
 398. Hänninen, A., Maksimow, M., Alam, C., Morgan, D. J. & Jalkanen, S. Ly6C supports preferential homing of central memory CD8⁺ T cells into lymph nodes. *Eur. J. Immunol.* **41**, 634–44 (2011).
 399. Stelekati, E. *et al.* Bystander chronic infection negatively impacts development of CD8(+) T cell memory. *Immunity* **40**, 801–13 (2014).
 400. Chu, T. *et al.* Bystander-activated memory CD8 T cells control early pathogen load in an innate-like, NKG2D-dependent manner. *Cell Rep.* **3**, 701–8 (2013).
 401. Sckisel, G. D. *et al.* Out-of-Sequence Signal 3 Paralyzes Primary CD4(+) T-Cell-Dependent Immunity. *Immunity* **43**, 240–50 (2015).
 402. Banczyk, D. *et al.* Activated CD4⁺ T cells enter the splenic T-cell zone and induce autoantibody-producing germinal centers through bystander activation. *Eur. J. Immunol.* **44**, 93–102 (2014).
 403. Blander, J. M. & Medzhitov, R. Toll-dependent selection of microbial antigens for presentation by dendritic cells. *Nature* **440**, 808–12 (2006).
 404. Nair-Gupta, P. *et al.* TLR signals induce phagosomal MHC-I delivery from the endosomal recycling compartment to allow cross-presentation. *Cell* **158**, 506–21 (2014).
 405. Ruffell, B. *et al.* Macrophage IL-10 Blocks CD8⁺ T Cell-Dependent Responses to Chemotherapy by Suppressing IL-12 Expression in Intratumoral Dendritic Cells. *Cancer Cell* **26**, 623–37 (2014).
 406. Geiger, R. *et al.* L-Arginine Modulates T Cell Metabolism and Enhances Survival and

- Anti-tumor Activity. *Cell* **167**, 829–42 (2016).
407. Tinoco, R., Alcalde, V., Yang, Y., Sauer, K. & Zuniga, E. I. Cell-Intrinsic Transforming Growth Factor- β Signaling Mediates Virus-Specific CD8⁺ T Cell Deletion and Viral Persistence In Vivo. *Immunity* **31**, 145–57 (2009).
 408. Stephen, T. L. *et al.* SATB1 Expression Governs Epigenetic Repression of PD-1 in Tumor-Reactive T Cells. *Immunity* **46**, 51–64 (2017).
 409. Huang, Y.-H. *et al.* CEACAM1 regulates TIM-3-mediated tolerance and exhaustion. *Nature* **517**, 386–90 (2015).
 410. Zang, Y. C. Q. *et al.* Increased CD8⁺ cytotoxic T cell responses to myelin basic protein in multiple sclerosis. *J. Immunol.* **172**, 5120–7 (2004).
 411. Arif, S. *et al.* Autoreactive T cell responses show proinflammatory polarization in diabetes but a regulatory phenotype in health. *J. Clin. Invest.* **113**, 451–63 (2004).
 412. Ashouri, J. F. & Weiss, A. Endogenous Nur77 Is a Specific Indicator of Antigen Receptor Signaling in Human T and B Cells. *J. Immunol.* **198**, 657–68 (2017).
 413. Villarino, A. V. *et al.* Posttranscriptional Silencing of Effector Cytokine mRNA Underlies the Anergic Phenotype of Self-Reactive T Cells. *Immunity* **34**, 50–60 (2011).
 414. Gartlan, K. H. *et al.* Tc17 cells are a proinflammatory, plastic lineage of pathogenic CD8⁺ T cells that induce GVHD without antileukemic effects. *Blood* **126**, 1609–20 (2015).
 415. Srenathan, U., Steel, K. & Taams, L. S. IL-17⁺ CD8⁺ T cells: Differentiation, phenotype and role in inflammatory disease. *Immunol. Lett.* **178**, 20–6 (2016).
 416. Chellappa, S. *et al.* CD8⁺ T Cells That Coexpress ROR γ t and T-bet Are Functionally Impaired and Expand in Patients with Distal Bile Duct Cancer. *J. Immunol.* **198**, 1729–39 (2017).
 417. Cheuk, S. *et al.* Epidermal Th22 and Tc17 Cells Form a Localized Disease Memory in Clinically Healed Psoriasis. *J. Immunol.* **192**, 3111–3120 (2014).
 418. Huber, M. *et al.* IL-17A secretion by CD8⁺ T cells supports Th17-mediated autoimmune encephalomyelitis. *J. Clin. Invest.* **123**, 247–60 (2013).
 419. Tang, Y. *et al.* Antigen-specific effector CD8 T cells regulate allergic responses via IFN- γ and dendritic cell function. *J. Allergy Clin. Immunol.* **129**, 1611–20 (2012).
 420. Purvis, H. A. *et al.* Low-strength T-cell activation promotes Th17 responses. *Blood* **116**, 4829–37 (2010).
 421. Brunner-Weinzierl, M. C. *et al.* Plasticity along with differentiation of Tc17 cells is controlled by CTLA-4 (CD152). AAI 2016, Seattle. *J. Immunol.* **196** (Sup), 133.15 (2016).
 422. Apostolidis, S. A., Rauen, T., Hedrich, C. M., Tsokos, G. C. & Crispin, J. C. Protein phosphatase 2A enables expression of interleukin 17 (IL-17) through chromatin remodeling. *J. Biol. Chem.* **288**, 26775–84 (2013).
 423. Xin, A. *et al.* A molecular threshold for effector CD8⁺ T cell differentiation controlled by transcription factors Blimp-1 and T-bet. *Nat. Immunol.* **17**, 422–32 (2016).

424. Hasegawa, K. *et al.* PEST domain-enriched tyrosine phosphatase (PEP) regulation of effector/memory T cells. *Science* **303**, 685–9 (2004).
425. Dai, X. *et al.* A disease-associated PTPN22 variant promotes systemic autoimmunity in murine models. *J. Clin. Invest.* **123**, 2024–36 (2013).
426. Burn, G. L. *et al.* Superresolution imaging of the cytoplasmic phosphatase PTPN22 links integrin-mediated T cell adhesion with autoimmunity. *Sci. Signal.* **9**, ra99 (2016).
427. Salmond, R. J., Brownlie, R. J., Morrison, V. L. & Zamoyska, R. The tyrosine phosphatase PTPN22 discriminates weak self peptides from strong agonist TCR signals. *Nat. Immunol.* **15**, 875–83 (2014).
428. Whitmire, J. K., Eam, B. & Whitton, J. L. Mice deficient in stem cell antigen-1 (Sca1, Ly-6A/E) develop normal primary and memory CD4⁺ and CD8⁺ T-cell responses to virus infection. *Eur. J. Immunol.* **39**, 1494–504 (2009).
429. Flood, P. M., Dougherty, J. P. & Ron, Y. Inhibition of Ly-6A antigen expression prevents T cell activation. *J. Exp. Med.* **172**, 115–20 (1990).
430. Epting, C. L. *et al.* Stem cell antigen-1 is necessary for cell-cycle withdrawal and myoblast differentiation in C2C12 cells. *J. Cell Sci.* **117**, 6185–95 (2004).
431. Goplen, N. P. *et al.* IL-12 Signals through the TCR To Support CD8 Innate Immune Responses. *J. Immunol.* **197**, 2434–43 (2016).
432. Xu, H. *et al.* IL-12 Enhances Lymphoaccumulation by Suppressing Cell Death of T Cells in MRL- lpr/lpr Mice. *J. Autoimmun.* **16**, 87–95 (2001).
433. Chan, B. *et al.* SAP couples Fyn to SLAM immune receptors. *Nat. Cell Biol.* **5**, 155–60 (2003).
434. Proust, R., Bertoglio, J. & Gesbert, F. The Adaptor Protein SAP Directly Associates with CD3 ζ Chain and Regulates T Cell Receptor Signaling. *PLoS One* **7**, e43200 (2012).
435. Kristjansdottir, H. *et al.* Lower expression levels of the programmed death 1 receptor on CD4⁺CD25⁺ T cells and correlation with the PD-1.3A genotype in patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* **62**, 1702–11 (2010).
436. Rivero, S. J., Díaz-Jouanen, E. & Alarcón-Segovia, D. Lymphopenia in systemic lupus erythematosus. Clinical, diagnostic, and prognostic significance. *Arthritis Rheum.* **21**, 295–305 (1978).
437. Shvets, A. *et al.* Impaired negative regulation of homeostatically proliferating T cells. *Blood* **113**, 622–5 (2009).
438. Penaranda, C. *et al.* IL-7 receptor blockade reverses autoimmune diabetes by promoting inhibition of effector/memory T cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **109**, 12668–73 (2012).
439. Voelkl, S., Gary, R. & Mackensen, A. Characterization of the immunoregulatory function of human TCR- $\alpha\beta$ ⁺ CD4⁻ CD8⁻ double-negative T cells. *Eur. J. Immunol.* **41**, 739–48 (2011).

440. Lombardi, G., Sidhu, S., Batchelor, R. & Lechler, R. Anergic T cells as suppressor cells in vitro. *Science* **264**, 1587–9 (1994).
441. Barthlott, T., Kassiotis, G. & Stockinger, B. T cell regulation as a side effect of homeostasis and competition. *J. Exp. Med.* **197**, 451–60 (2003).
442. Probst, H. C., Dumrese, T. & van den Broek, M. F. Cutting edge: competition for APC by CTLs of different specificities is not functionally important during induction of antiviral responses. *J. Immunol.* **168**, 5387–91 (2002).
443. Smith, A. L., Wikstrom, M. E. & Fazekas de St Groth, B. Visualizing T cell competition for peptide/MHC complexes: a specific mechanism to minimize the effect of precursor frequency. *Immunity* **13**, 783–94 (2000).
444. Borghans, J. A., Taams, L. S., Wauben, M. H. & de Boer, R. J. Competition for antigenic sites during T cell proliferation: a mathematical interpretation of in vitro data. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **96**, 10782–7 (1999).
445. Kedl, R. M. *et al.* T cells compete for access to antigen-bearing antigen-presenting cells. *J. Exp. Med.* **192**, 1105–13 (2000).
446. Scherer, A., Salathé, M. & Bonhoeffer, S. High epitope expression levels increase competition between T cells. *PLoS Comput. Biol.* **2**, e109 (2006).
447. Hayball, J. D., Robinson, B. W. S. & Lake, R. A. CD4⁺ T cells cross-compete for MHC class II-restricted peptide antigen complexes on the surface of antigen presenting cells. *Immunol. Cell Biol.* **82**, 103–11 (2004).
448. Weaver, J. M., Chaves, F. A. & Sant, A. J. Abortive activation of CD4 T cell responses during competitive priming in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **106**, 8647–52 (2009).
449. Willis, R. A., Kappler, J. W. & Marrack, P. C. CD8 T cell competition for dendritic cells in vivo is an early event in activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **103**, 12063–8 (2006).
450. Catron, D. M., Rusch, L. K., Hataye, J., Itano, A. A. & Jenkins, M. K. CD4⁺ T cells that enter the draining lymph nodes after antigen injection participate in the primary response and become central-memory cells. *J. Exp. Med.* **203**, 1045–54 (2006).

VII. Anexos |

Informe de Idoneidad para el formato de tesis por artículos

Los Doctores **José Carlos Crispín Acuña, José Manuel Martín Villa y George C. Tsokos**, directores de la presente tesis titulada **“Origen y Caracterización de los Linfocitos TCR- $\alpha\beta^+$ CD4 $^-$ CD8 $^-$ Doble Negativos en relación a su posible naturaleza autorreactiva”**, presentada en la Universidad Complutense de Madrid y perteneciente al programa de **Doctorado en Ciencias Biomédicas (R.D. 1393/2007)** del departamento de Microbiología I de la Facultad de Medicina, hacemos constar la idoneidad de la presentación de la misma bajo la modalidad de compendio de publicaciones. Asimismo, hacemos constatar que nuestro doctorando, autor de esta Tesis, **Noé Rodríguez Rodríguez**, ha contribuido de forma activa e importante en todos los artículos que componen la Tesis: diseño experimental, ejecución de los experimentos, análisis de resultados y escritura del manuscrito.

Para que así conste se detalla a continuación la información de los artículos:

Título de la publicación: Programmed cell death 1 and Helios distinguish TCR- $\alpha\beta^+$ double-negative (CD4-CD8-) T cells that derive from self-reactive CD8 T cells

Autores: Noé Rodríguez-Rodríguez, Sokratis A. Apostolidis, Pablo Penaloza-MacMaster, José Manuel Martín-Villa, Dan H. Barouch, George C. Tsokos & José C. Crispín

Revista: *The Journal of Immunology*, 194(9): 4207-14. 2015

Factor de Impacto en el año de la publicación o inmediatamente previo: 4.985

Título de la publicación: Pro-inflammatory self-reactive T cells are found within murine TCR- $\alpha\beta^+$ CD4(-) CD8(-) PD-1(+) cells

Autores: Noé Rodríguez-Rodríguez, Sokratis A. Apostolidis, Lauren Fitzgerald, Bronwyn S. Meehan, Alexandra J Corbett, José Manuel Martín-Villa, James McCluskey, George C. Tsokos & José C. Crispín

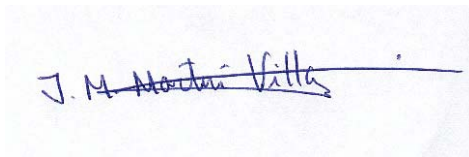
Revista: *European Journal of Immunology*, 46(6): 1383-91. 2016

Factor de Impacto en el año de la publicación o inmediatamente previo: 4.179

Y para que conste a efectos de la comisión evaluadora esta tesis firmamos el presente certificado:



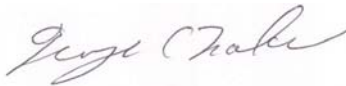
José Carlos Crispín Acuña, Ciudad de México a 22 de febrero de 2017



MARTIN
VILLA JOSE
MANUEL -
05377375K

Firmado digitalmente por
MARTIN VILLA JOSE MANUEL -
05377375K
Nombre de reconocimiento (DN):
c=ES, serialNumber=05377375K,
sn=MARTIN VILLA,
givenName=JOSE MANUEL,
cn=MARTIN VILLA JOSE MANUEL
- 05377375K
Fecha: 2017.02.23 08:45:59
+01'00'

José Manuel Martín Villa, Madrid a 22 de febrero de 2017



George C. Tsokos, Boston a 22 de febrero de 2017



The Journal of Immunology

Editor-in-Chief

Pamela J. Fink, Ph.D.

**Executive Director
and Executive Editor**

M. Michele Hogan, Ph.D.

Publication Director

Kaylene J. Kenyon, Ph.D.

**Chair, Publications
Committee**

Eugene M. Oltz, Ph.D.

July 25, 2016

Noe Rodriguez-Rodriguez

Instituto Nacional de Ciencias Medicas y Nutricion Salvador Zuriban

Vasco de Quiroga 15, Tlalpan

Mexico city, 14080 Mexico

Email: noahrodriguez2@gmail.com

Dear Dr. Rodriguez-Rodriguez,

The American Association of Immunologists, Inc., grants permission to reproduce the article, "Programmed cell death 1 and Helios distinguish TCR- $\alpha\beta$ + double-negative (CD4-CD8-) T cells that derive from self-reactive CD8 T cells," published in *The Journal of Immunology*, vol. 194, pp. 4207-4214, 2015, in your thesis, contingent on the following conditions:

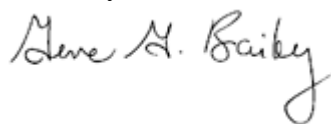
1. That you give proper credit to the authors and to *The Journal of Immunology*, including in your citation the volume, date, and page numbers.
2. That you include the statement:

Copyright 2015. The American Association of Immunologists, Inc.

3. That permission is granted for one-time use only for print and electronic format. Permission must be requested separately for future editions, revisions, derivative works, and promotional pieces. Reproduction of any content, other than figures and figure legends, from *The Journal of Immunology* is permitted in English only.

Thank you for your interest in *The Journal of Immunology*.

Sincerely,



Gene Bailey

Senior Editorial Manager

The Journal of Immunology

THE AMERICAN ASSOCIATION OF IMMUNOLOGISTS

**JOHN WILEY AND SONS LICENSE
TERMS AND CONDITIONS**

Feb 22, 2017

This Agreement between Noe Rodriguez Rodriguez ("You") and John Wiley and Sons ("John Wiley and Sons") consists of your license details and the terms and conditions provided by John Wiley and Sons and Copyright Clearance Center.

License Number	4054500867432
License date	Feb 22, 2017
Licensed Content Publisher	John Wiley and Sons
Licensed Content Publication	European Journal of Immunology
Licensed Content Title	Pro-inflammatory self-reactive T cells are found within murine TCR- $\alpha\beta$ +CD4-CD8-PD-1+ cells
Licensed Content Author	Noé Rodríguez-Rodríguez, Sokratis A. Apostolidis, Lauren Fitzgerald, Bronwyn S. Meehan, Alexandra J. Corbett, José Manuel Martín-Villa, James McCluskey, George C. Tsokos, José C. Crispín
Licensed Content Date	Apr 26, 2016
Licensed Content Pages	9
Type of use	Dissertation/Thesis
Requestor type	Author of this Wiley article
Format	Print and electronic
Portion	Full article
Will you be translating?	Yes, including English rights
Number of languages	1
Languages	Spanish
Title of your thesis / dissertation	Origen y Caracterización de los Linfocitos TCR- $\alpha\beta$ +CD4-CD8- Doble Negativos en relación a su posible naturaleza autorreactiva
Expected completion date	Mar 2017
Expected size (number of pages)	200
Requestor Location	Noe Rodriguez Rodriguez Vasco de Quiroga 15 San Jeronimo Lidice Mexico City, 14080 Mexico Attn: Noah Rodriguez
Publisher Tax ID	EU826007151
Billing Type	Invoice
Billing Address	Noah Rodriguez Vasco de Quiroga 15 San Jeronimo Lidice Mexico City, Mexico 14080

Attn: Noe Rodriguez Rodriguez

Total

0.00 USD

[Terms and Conditions](#)

TERMS AND CONDITIONS

This copyrighted material is owned by or exclusively licensed to John Wiley & Sons, Inc. or one of its group companies (each a "Wiley Company") or handled on behalf of a society with which a Wiley Company has exclusive publishing rights in relation to a particular work (collectively "WILEY"). By clicking "accept" in connection with completing this licensing transaction, you agree that the following terms and conditions apply to this transaction (along with the billing and payment terms and conditions established by the Copyright Clearance Center Inc., ("CCC's Billing and Payment terms and conditions"), at the time that you opened your RightsLink account (these are available at any time at <http://myaccount.copyright.com>).

Terms and Conditions

- The materials you have requested permission to reproduce or reuse (the "Wiley Materials") are protected by copyright.
- You are hereby granted a personal, non-exclusive, non-sub licensable (on a stand-alone basis), non-transferable, worldwide, limited license to reproduce the Wiley Materials for the purpose specified in the licensing process. This license, **and any CONTENT (PDF or image file) purchased as part of your order**, is for a one-time use only and limited to any maximum distribution number specified in the license. The first instance of republication or reuse granted by this license must be completed within two years of the date of the grant of this license (although copies prepared before the end date may be distributed thereafter). The Wiley Materials shall not be used in any other manner or for any other purpose, beyond what is granted in the license. Permission is granted subject to an appropriate acknowledgement given to the author, title of the material/book/journal and the publisher. You shall also duplicate the copyright notice that appears in the Wiley publication in your use of the Wiley Material. Permission is also granted on the understanding that nowhere in the text is a previously published source acknowledged for all or part of this Wiley Material. Any third party content is expressly excluded from this permission.
- With respect to the Wiley Materials, all rights are reserved. Except as expressly granted by the terms of the license, no part of the Wiley Materials may be copied, modified, adapted (except for minor reformatting required by the new Publication), translated, reproduced, transferred or distributed, in any form or by any means, and no derivative works may be made based on the Wiley Materials without the prior permission of the respective copyright owner. **For STM Signatory Publishers clearing permission under the terms of the [STM Permissions Guidelines](#) only, the terms of the license are extended to include subsequent editions and for editions in other languages, provided such editions are for the work as a whole in situ and does not involve the separate exploitation of the permitted figures or extracts**, You may not alter, remove or suppress in any manner any copyright, trademark or other notices displayed by the Wiley Materials. You may not license, rent, sell, loan,

Dr. José C. Crispín

Número de Pasaporte y País: 12816444732 (México)

Teléfono: +52-1-54870900 ext. 2610

Correo electrónico: jcrispin@autoimmunilab.com

MANIFIESTA QUE:

Como coautor DOCTOR de los artículos integrados en la tesis que presenta Don Noé Rodríguez Rodríguez, quedo informado de que tiene solicitada la autorización de la Comisión Académica del Doctorado de Ciencias Biomédicas de la Universidad Complutense de Madrid para la presentación del ejemplar de su tesis en formato de compendio de publicaciones y, por lo tanto, autorizo la inclusión de los artículos de los que formo parte como coautor.

Asimismo manifiesto que en base a mi conocimiento, estos artículos no han sido previamente utilizados en, ni formarán parte en el futuro de otras tesis doctorales.

Relación de artículos:

Título: Pro-inflammatory self-reactive T cells are found within murine TCR- $\alpha\beta$ (+) CD4(-) CD8(-) PD-1(+) cells

Año: 2016

Revista: *European Journal of Immunology*

Volumen: 46(6); pags. 1383-91.

Título: Programmed cell death 1 and Helios distinguish TCR- $\alpha\beta$ + double-negative (CD4-CD8-) T cells that derive from self-reactive CD8 T cells.

Año: 2015

Revista: *The Journal of Immunology*.

Volumen: 194(9), pags. 4207-14.

Ciudad de México a 20 de febrero de 2017.

Firmado



Dr. José Manuel Martín Villa

Número de Pasaporte y País:

Teléfono: +34913941642

Correo electrónico: jmmvilla@ucm.es

MANIFIESTA QUE:

Como coautor DOCTOR de los artículos integrados en la tesis que presenta Don Noé Rodríguez Rodríguez, quedo informado de que tiene solicitada la autorización de la Comisión Académica del Doctorado de Ciencias Biomédicas de la Universidad Complutense de Madrid para la presentación del ejemplar de su tesis en formato de compendio de publicaciones y, por lo tanto, autorizo la inclusión de los artículos de los que formo parte como coautor.

Asimismo manifiesto que en base a mi conocimiento, estos artículos no han sido previamente utilizados en, ni formarán parte en el futuro de otras tesis doctorales.

Relación de artículos:

Título: Pro-inflammatory self-reactive T cells are found within murine TCR- $\alpha\beta$ (+) CD4(-) CD8(-) PD-1(+) cells

Año: 2016

Revista: *European Journal of Immunology*

Volumen: 46(6); pags. 1383-91.

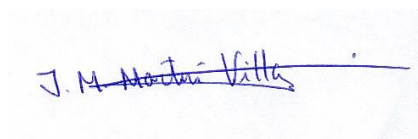
Título: Programmed cell death 1 and Helios distinguish TCR- $\alpha\beta$ + double-negative (CD4-CD8-) T cells that derive from self-reactive CD8 T cells.

Año: 2015

Revista: *The Journal of Immunology*.

Volumen: 194(9), pags. 4207-14.

Madrid a 20 de febrero de 2017.

A handwritten signature in blue ink that reads "J. M. Martín Villa". The signature is written over a light blue horizontal line.

Firmado

Dr. Sokratis A. Apostolidis

Passport Number & Country: AE8656962, Greece

Phone Number: +61-83449910

Email address: socrates.apostolidis@gmail.com

I HEREBY ASSURE THAT:

As a MD co-author of the publications that integrate the PhD dissertation presented by Mr. **Noé Rodríguez Rodríguez**, I am aware that he has requested permission to the Academic Board of the Biomedical Science PhD program at the Complutense University of Madrid to submit a copy of his thesis in the format of combined published manuscripts, and that therefore I grant permission to include in this dissertation the manuscript I share authorship of.

I warrant that these publications have not been part of any other PhD dissertation that I am aware of and will not be used in any other PhD thesis.

List of publications:

Title: Pro-inflammatory self-reactive T cells are found within murine TCR- $\alpha\beta$ (+) CD4(-) CD8(-) PD-1(+) cells

Year: 2016

Journal: *European Journal of Immunology*

Issue: 46(6); pags. 1383-91.

Title: Programmed cell death 1 and Helios distinguish TCR- $\alpha\beta$ + double-negative (CD4-CD8-) T cells that derive from self-reactive CD8 T cells.

Year: 2015

Journal: *The Journal of Immunology*.

Issue: 194(9), pags. 4207-14.

Pittsburgh, February 15th 2017

Signature

A handwritten signature in purple ink, consisting of stylized, overlapping loops and a long horizontal stroke extending to the right.

Prof. Dan H. Barouch

Passport Number & Country:

USA / 488793902

Phone Number: +1-617-735-4485

Email address: dbarouch@bidmc.harvard.edu

I HEREBY ASSURE THAT:

As a PhD co-author of the publications that integrate the PhD dissertation presented by Mr. **Noé Rodríguez Rodríguez**, I am aware that he has requested permission to the Academic Board of the Biomedical Science PhD program at the Complutense University of Madrid to submit a copy of his thesis in the format of combined published manuscripts, and that therefore I grant permission to include in this dissertation the manuscript I share authorship of.

I warrant that these publications have not been part of any other PhD dissertation that I am aware of and will not be used in any other PhD thesis.

List of publications:

Title: Programmed cell death 1 and Helios distinguish TCR- $\alpha\beta$ + double-negative (CD4-CD8-) T cells that derive from self-reactive CD8 T cells.

Year: 2015

Journal: *The Journal of Immunology*.

Issue: 194(9), pags. 4207-14.

Boston, February 20th 2017



Signature

Dan Barouch, MD, PhD

Dr. Pablo Peñaloza MacMaster



Número de Pasaporte y País: Pasaporte USA – xxx

Teléfono: +1 312-503-5240

Correo electrónico: ppm@northwestern.edu

MANIFIESTA QUE:

Como coautor DOCTOR de los artículos integrados en la tesis que presenta Don Noé Rodríguez Rodríguez, quedo informado de que tiene solicitada la autorización de la Comisión Académica del Doctorado de Ciencias Biomédicas de la Universidad Complutense de Madrid para la presentación del ejemplar de su tesis en formato de compendio de publicaciones y, por lo tanto, autorizo la inclusión de los artículos de los que formo parte como coautor.

Asimismo manifiesto que en base a mi conocimiento, estos artículos no han sido previamente utilizados en, ni formarán parte en el futuro de otras tesis doctorales.

Relación de artículos:

Título: Programmed cell death 1 and Helios distinguish TCR- $\alpha\beta$ + double-negative (CD4-CD8-) T cells that derive from self-reactive CD8 T cells.

Año: 2015

Revista: *The Journal of Immunology*.

Volumen: 194(9), pags. 4207-14.

Chicago a 20 de febrero de 2017.

Firmado

A handwritten signature in black ink, appearing to read "Pablo Penaloza".

Pablo Penaloza, Ph.D. Assistant Professor

Microbiology and Immunology, Northwestern University, 303 E. Chicago Ave. Tarry 6-728

Chicago, IL 60611

L: (312) 503-0357

O: (312) 503-5240

F: (312) 503-0359



Dr. Alexandra J. Corbett
ARC Future Fellow
Phone Number: +61-83449914
Email address: corbetta@unimelb.edu.au

February 15, 2017

To whom it may concern

I HEREBY ASSURE THAT:

As a PhD co-author of the publications that integrate the PhD dissertation presented by Mr. **Noé Rodríguez Rodríguez**, I am aware that he has requested permission to the Academic Board of the Biomedical Science PhD program at the Complutense University of Madrid to submit a copy of his thesis in the format of combined published manuscripts, and that therefore I grant permission to include in this dissertation the manuscript I share authorship of.

I warrant that these publications have not been part of any other PhD dissertation that I am aware of and will not be used in any other PhD thesis.

List of publications:

Title: Pro-inflammatory self-reactive T cells are found within murine TCR- $\alpha\beta$ (+) CD4(-) CD8(-) PD-1(+) cells

Year: 2016

Journal: *European Journal of Immunology*

Issue: 46(6); pags. 1383-91.

Yours sincerely,

Dr Alexandra J. Corbett
ARC Future Fellow
Department of Microbiology and Immunology
Peter Doherty Institute for Infection & Immunity
The University of Melbourne

Ms. Bronwyn S. Meehan

Passport Number & Country: *Australia*

Phone Number: +61-83440775

Email address: bmeehan@unimelb.edu.au

I HEREBY ASSURE THAT:

As a non-PhD co-author of the publications that integrate the PhD dissertation presented by Mr. **Noé Rodríguez Rodríguez**, I am aware that he has requested permission to the Academic Board of the Biomedical Science PhD program at the Complutense University of Madrid to submit a copy of his thesis in the format of combined published manuscripts, and that therefore I grant permission to include in this dissertation the manuscript I share authorship of.

I warrant that these publications have not been part of any other PhD dissertation that I am aware of and will not be used in any other PhD thesis.

List of publications:

Title: Pro-inflammatory self-reactive T cells are found within murine TCR- $\alpha\beta$ (+) CD4(-) CD8(-) PD-1(+) cells

Year: 2016

Journal: *European Journal of Immunology*

Issue: 46(6); pags. 1383-91.

Melbourne, February 20th 2017

Signature





Deputy Vice Chancellor Research
The University of Melbourne:
Phone Number: +61-83443238
Email address: dvc-research@unimelb.edu.au

February 15, 2017

To whom it may concern

I hereby assure that:

As a PhD co-author of the publications that integrate the PhD dissertation presented by Mr. **Noé Rodríguez Rodríguez**, I am aware that he has requested permission to the Academic Board of the Biomedical Science PhD program at the Complutense University of Madrid to submit a copy of his thesis in the format of combined published manuscripts, and that therefore I grant permission to include in this dissertation the manuscript I share authorship of.

I warrant that these publications have not been part of any other PhD dissertation that I am aware of and will not be used in any other PhD thesis.

List of publications:

Title: Pro-inflammatory self-reactive T cells are found within murine TCR- $\alpha\beta$ (+) CD4(-) CD8(-) PD-1(+) cells

Year: 2016

Journal: *European Journal of Immunology*

Issue: 46(6); pages. 1383-91.

Yours sincerely,

James McCluskey, FAA FAHMS
Deputy Vice Chancellor (Research)
Redmond Barry Distinguished Professor
The University of Melbourne

Lauren Fitzgerald

Passport Number & Country:

Phone Number: 1-978-317-4003

Email address: lfitzgerald7@gmail.com

I HEREBY ASSURE THAT:

As a non-PhD co-author of the publications that integrate the PhD dissertation presented by Mr. **Noé Rodríguez Rodríguez**, I am aware that he has requested permission to the Academic Board of the Biomedical Science PhD program at the Complutense University of Madrid to submit a copy of his thesis in the format of combined published manuscripts, and that therefore I grant permission to include in this dissertation the manuscript I share authorship of.

I warrant that these publications have not been part of any other PhD dissertation that I am aware of and will not be used in any other PhD thesis.

List of publications:

Title: Pro-inflammatory self-reactive T cells are found within murine TCR- $\alpha\beta$ (+) CD4(-) CD8(-) PD-1(+) cells

Year: 2016

Journal: *European Journal of Immunology*

Issue: 46(6); pags. 1383-91.

Philadelphia, February 20th 2017

Signature





George C. Tsokos, M.D.

**Chief, Division of Rheumatology
Department of Medicine**

Professor of Medicine

Passport Number & Country: 490899510; United States of America

Phone Number: 617-735-4160

Email address: gtsokos@bidmc.harvard.edu

I HEREBY ASSURE THAT:

As a MD co-author of the publications that integrate the PhD dissertation presented by Mr. **Noé Rodríguez Rodríguez**, I am aware that he has requested permission to the Academic Board of the Biomedical Science PhD program at the Complutense University of Madrid to submit a copy of his thesis in the format of combined published manuscripts, and that therefore I grant permission to include in this dissertation the manuscript I share authorship of.

I warrant that these publications have not been part of any other PhD dissertation that I am aware of and will not be used in any other PhD thesis.

List of publications:

Title: Pro-inflammatory self-reactive T cells are found within murine TCR- $\alpha\beta$ (+) CD4(-) CD8(-) PD-1(+) cells

Year: 2016

Journal: *European Journal of Immunology*

Issue: 46(6); pages. 1383-91.

Title: Programmed cell death 1 and Helios distinguish TCR- $\alpha\beta$ + double-negative (CD4-CD8-) T cells that derive from self-reactive CD8 T cells.

Year: 2015

Journal: *The Journal of Immunology*.

Issue: 194(9), pages. 4207-14.

Boston, February 20th 2017

Dr. George Tsokos

